

Université de Montréal

**Vers une meilleure compréhension de la pathogenèse de la
maladie osseuse reliée à la fibrose kystique**

par

Valérie Orlando

Département de Médecine, Université de Montréal
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en Sciences Biomédicales
option générale

Août, 2015

© Valérie Orlando, 2015

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**Vers une meilleure compréhension de la pathogenèse de la maladie
osseuse reliée à la fibrose kystique**

Présenté par:
Valérie Orlando

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Président-rapporteur:
Emmanuelle Brochiero

Directrice de recherche:
Geneviève Mailhot

Membre du jury:
Simon Rousseau

Résumé

Les patients atteints de la fibrose kystique (FK) ont désormais un âge médian de survie dépassant la cinquantaine. Par contre, avec ce vieillissement surviennent de nouvelles complications dont l'une des plus prévalente est la maladie osseuse associée à la FK. Les souris dont le *Cftr* est invalidé génétiquement présentent une densité osseuse amoindrie qui découle d'un débalancement du remodelage osseux caractérisé par une diminution de la formation et une augmentation de la résorption osseuse. L'observation que plusieurs modèles murins FK ont un phénotype ostéopénique et ce, même en absence de certains facteurs étiologiques (inflammation chronique, prise de glucocorticoïdes, insuffisance pancréatique etc.) laisse croire que le *Cftr*, le gène muté dans la FK, joue un rôle non-négligeable dans le métabolisme osseux. Le présent projet étudiera l'impact de l'absence du CFTR, sur les ostéoblastes (Ob) et ostéoclastes (Oc) dans un modèle murin de FK, soit les souris *Cftr*^{-/-} de souche BALB/c. De plus, les Ob, sont reconnus comme ayant un effet modulateur sur le microenvironnement leucocytaire de la moelle osseuse (MO). Ce projet visera également à investiguer l'impact de l'absence du CFTR sur la niche leucocytaire de la MO. Nos résultats de densitométrie osseuse et de microtomographie à rayons X ont confirmé que les souris *Cftr*^{-/-} ont une densité osseuse et un contenu minéral osseux abaissé, une diminution du volume osseux trabéculaire, un nombre amoindri de travées osseuses et une plus grande séparation entre les travées comparé aux souris *Cftr*^{+/+}. Afin de mieux comprendre ce phénotype osseux, nous avons vérifié et confirmé que l'expression génique et protéique du CFTR est présente chez des Ob dérivés de la MO, mais est absent au niveau des Oc dérivés de la MO. Ces observations corroborent nos résultats portant sur la différenciation des cellules osseuses où nous avons démontré que seule la différenciation et fonction ostéoblastique sont affectées par l'absence du CFTR. Ce défaut ostéoblastique semble influencer négativement la leucopoïèse puisque nous observons une quantité moindre de cellules T, de macrophages et de cellules dendritiques chez les souris *Cftr*^{-/-} vs. *Cftr*^{+/+}. À la lumière de ces résultats, l'absence du CFTR semble avoir un impact important sur les ostéoblastes et la moelle osseuse.

Mots-clés : Fibrose kystique, maladie osseuse, CFTR, ostéoblaste, moelle osseuse, leucopoïèse

Abstract

With cystic fibrosis (CF) patients now being able to live past fifty years of age come a multitude of secondary complications; one of the most important being cystic fibrosis-related bone disease (CFBD). In *Cftr*-null mice, this disease is characterized by a low bone mineral density caused by an uncoupled bone remodeling. However, the observation that various models of CF mice display a bone phenotype despite the absence of the usual human confounders (i.e. inflammation, steroid hormone use, pancreatic insufficiency, etc.) led us to propose that CFTR, itself, plays a non-negligible role in the regulation of bone metabolism. This project will study the impact of the absence of CFTR on the osteoblasts (Ob) and osteoclasts (Oc) in a CF mouse model, namely the BALB/c *Cftr*^{-/-} mice. In addition, Ob are recognized as having a modulating effect on the leukocyte microenvironment of the bone marrow (BM). This project will also investigate the impact of the absence of CFTR on the leukocyte niche in the BM. Our bone densitometry and X-ray microtomography results showed that *Cftr*^{-/-} mice have lower bone density and bone mineral content vs. *Cftr*^{+/+} mice as well as a decrease in trabecular bone volume and trabecular number, and a greater trabecular separation. To further understand this bone phenotype, we confirmed that BM-derived Ob expressed CFTR at the gene and protein level, but not BM-derived osteoclasts. Such observations support our findings showing that only Ob differentiation and function were affected by the absence of CFTR. The osteoblastic defect appears to adversely affect the BM leukopoiesis as decreased numbers of T cells, macrophages and dendritic cells were observed in *Cftr*^{-/-} mice vs. *Cftr*^{+/+}. In light of these findings, we believe that the absence of CFTR has an important impact on the Ob and the bone marrow.

Keywords : Cystic fibrosis, bone disease, CFTR, osteoblast, bone marrow, leukopoiesis

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures.....	vi
Liste des abréviations.....	viii
Dédicace.....	ix
Remerciements.....	x
Introduction.....	15
Chapitre 2. Problématique, Hypothèses et Objectifs	47
2.1 Problématique	47
2.2 Hypothèses et Objectifs	48
Chapitre 3. Matériels et méthodes	50
Chapitre 4. Résultats	62
4.1 Caractérisation du phénotype osseux du modèle murin FK	62
4.2 Étude de certains facteurs étiologiques de la CFBD.....	66
4.3 Analyses de l'expression du CFTR par les cellules osseuses dérivées de la MO	68
4.4 Impact de l'absence du <i>Cftr</i> sur les cellules osseuses	70
4.4.1 Profil de différenciation des Oc dans un modèle murin <i>Cftr</i> <i>-/-</i>	70
4.4.2 Profil de différenciation des Ob dans un modèle murin <i>Cftr</i> <i>-/-</i>	71
4.4.3 Impact de l'absence du <i>Cftr</i> sur le profil cellulaire immunitaire.....	74
Chapitre 5. Discussion	78
5.1 Caractérisation du phénotype osseux.....	78

5.2 Étude de certains facteurs pathogéniques	82
5.3 Analyses de l'expression du CFTR par les cellules osseuses dérivées de la MO	84
5.4 Impact de l'absence du <i>Cftr</i> sur les cellules osseuses	87
5.4.1 Profil de différenciation des Oc dans un modèle murin <i>Cftr</i> <i>-/-</i>	87
5.4.2 Profil de différenciation des Ob dans un modèle murin <i>Cftr</i> <i>-/-</i>	89
5.5 Impact de l'absence du <i>Cftr</i> sur le profil cellulaire immunitaire.....	91
Chapitre 6. Perspectives futures et conclusion	97
Bibliographie.....	99

Liste des tableaux

Tableau 1: Conditions de PCR pour les ostéoblastes dérivés de la moëlle osseuse

Tableau 2: Conditions de marquage de cytométrie en flux

Tableau 3: Compilation des données publiées sur le phénotype osseux des différents modèles murins FK

Tableau 4: Résumé de notre caractérisation du phénotype osseux

Liste des figures

Figure 1 : Structure d'un os long

Figure 2 : Schéma des cellules osseuses

Figure 3: La régulation génique de la différenciation ostéoblastique

Figure 4: Schéma d'un ostéoclaste

Figure 5: Évolution de la masse osseuse au cours de la vie

Figure 6: Cycle de remodelage de l'os

Figure 7: Anatomie de la moelle osseuse

Figure 8: La différenciation des cellules souches hématopoïétiques

Figure 9 : Structure du CFTR

Figure 10 : Classes de mutations du CFTR

Figure 11: Complications les plus communes en fonction de l'âge

Figure 12: Caractérisation des données anthropométriques

Figure 13: Caractérisation du phénotype osseux par densitométrie osseuse

Figure 14: Caractérisation de la microarchitecture osseuse par μ -CT

Figure 15: Concentration sérique de 17β -estradiol des souris femelles

Figure 16: Analyse de la malnutrition et de la malabsorption

Figure 17: Expression génique et protéique du CFTR par les cellules osseuses

Figure 18: Effet de l'absence du *Cftr* sur la différenciation ostéoclastique dérivée de la moelle osseuse

Figure 19: Impact de l'absence du *Cftr* sur la différenciation des ostéoblastes dérivés de la moelle osseuse

Figure 20: Impact de l'absence du *Cftr* sur la fonction ostéoblastique

Figure 21: Profil des cellules immunitaires de la moëlle osseuse

Figure 22: Profil des cellules immunitaires de la rate

Figure 23: Profil des cellules immunitaires des ganglions lymphatiques

Liste des abréviations

Alp: Phosphatase alcaline

CFBD: *Cystic fibrosis bone disease*

CFTR: *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*

Cl⁻: ion chlorure

Col1A: Collagène de type 1 alpha

DC: *Dendritic cell*

DLFK: Diabète lié à la fibrose kystique

FK: Fibrose kystique

HSCs: *Hematopoietic stem cells*

MO: Moelle osseuse

M-CSF: *Macrophage colony stimulating factor*

MSCs: *Mesenchymal stem cells*

NK: *Natural killer cell*

Ob: Ostéoblaste

Oc: Ostéoclaste

OCN: Ostéocalcine

OCP: Précuseurs d'ostéoclastes

OPG: Ostéoprotégérine

PTH: Parathormone

RANKL: *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*

RE: Réticulum endoplasmique

WT: *Wild Type*

Pour toi Diane (1961-1983),

«C'est le temps que tu as perdu pour ta rose qui fait ta rose si importante»

Le petit prince, Antoine de Saint-Exupéry

Remerciements

La réalisation d'une maîtrise est autant un travail personnel qu'un travail d'équipe. On m'avait dit au début de mon parcours en recherche que l'on travaille 99% du temps pour le 1% des résultats qui fonctionnent. Tout ce travail n'aurait jamais été possible sans toutes les personnes qui ont su me soutenir au cours de ces dernières années. J'aimerais tout d'abord remercier ma directrice de recherche Dre. Geneviève Mailhot. Merci de m'avoir donné une chance et de m'avoir fait confiance en m'accueillant dans ton équipe. Malgré mon année supplémentaire de cours pour être acceptée à la maîtrise, tu as toujours cru en moi et pour ça je t'en serai toujours reconnaissante. Je ne serais pas la scientifique que je suis maintenant sans ton support, ton aide et tes précieux conseils. J'ai bénéficié d'une excellente formatrice.

J'aimerais également remercier les membres du jury qui prendront le temps d'évaluer mon mémoire. J'espère qu'il mettra en lumière certains aspects de la Fibrose Kystique qui à ce jour restent toujours dans l'ombre.

Je tiens aussi à adresser mes sincères remerciements à Geneviève Morin qui non seulement était une assistante de recherche mais qui est devenue une bonne amie. J'ai apprécié ton aide tout au long de mes expériences (j'ai maintenant compris que 2×8 n'est pas égal à 12) de même que j'ai apprécié nos nombreux moments de plaisir en chantant du Toni Braxton au laboratoire. On dit que c'est l'environnement de travail qui rend un emploi plaisant et bien je peux vous dire à toi, Geneviève et à toutes les filles du laboratoire de Dre. Nuyt que ces dernières années ont été une expérience inoubliable.

De plus, j'aimerais remercier tout ceux qui m'ont aidé sur le plan expérimental dont notamment Kathie Béland, Saadallah Bouhanik et Nour El-Amine.

Un énorme merci à ma meilleure amie Corine Fontaine qui a pris le temps de relire et de corriger les nombreuses pages de ce mémoire. Tu as toujours su comment me changer les idées et m'encourager lorsque mes expériences ne fonctionnaient pas comme je le voulais.

Finalement le dernier remerciement, mais non le moindre. J'aimerais dire un énorme merci à mon frère, à ma mère et à mon père qui ont toujours cru en moi, il n'y a pas de mots pour vous exprimer toute ma gratitude. À ma mère, à qui j'ai toujours dit que j'allais travailler en recherche sur la fibrose kystique.

À ma tante Diane, atteinte de la fibrose kystique, qui n'a pas vu la fin de sa vingtaine. J'espère contribuer en ajoutant mon petit morceau au casse-tête de la recherche sur la fibrose kystique. Toute vie n'est pas absurde et vaut la peine d'être vécue. Un jour, vous recevrez le souffle de vie!

Introduction

1. L'os

1.1 Rôles de l'os

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé d'une importance indispensable pour l'organisme autant sur le plan métabolique que sur le plan biomécanique [1]. Sur le plan métabolique, le squelette est un réservoir de minéraux qui sont utilisés par toutes les cellules du corps humain. En effet celui-ci renferme 99 % du calcium et 90 % du phosphore de l'organisme. Le calcium joue un rôle important dans multiples processus biologiques, entre autres, la contraction musculaire, la coagulation sanguine, la transmission d'influx nerveux ainsi que la division cellulaire [2]. Sa composition chimique comporte 25 % d'eau, 30 % de substances organiques et 45 % de minéraux, essentiellement de l'hydroxyapatite de calcium ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) [3]. De plus, le tissu osseux a une fonction de support mécanique permettant la locomotion, il assure également la protection des organes internes et il s'agit du site majeur de l'hématopoïèse [4].

1.1.1 Structure de l'os

1.1.1.1 Structure macroscopique

Le squelette humain se divise en deux groupes: axial et appendiculaire. Le squelette axial suit l'axe longitudinal du corps et comprend les os de la tête, de la colonne vertébrale et de la cage thoracique [5], tandis que le squelette appendiculaire inclut les os des membres supérieurs et inférieurs, la ceinture scapulaire et la ceinture pelvienne. N'ayant pas les mêmes types d'os, ces deux squelettes jouent deux rôles distincts, le squelette axial a comme fonction de protéger, de soutenir ou de porter les autres parties du corps et donc ce squelette est beaucoup plus rigide que le squelette appendiculaire. Ce dernier forme une charpente beaucoup plus libre qui nous permet de nous déplacer [2]. Le corps humain est composé de 206 os qui sont divisés en quatre classes selon leur forme. On retrouve donc les os plats qui

sont minces et aplatis tels que les omoplates, le sternum, les côtes et les os du crâne, les os courts qui sont cubiques tels que les os de la cheville et du poignet, les os irréguliers tels que les vertèbres et les os iliaques et finalement les os longs qui sont beaucoup plus longs que larges, dont les os des membres (humérus, fémur, etc.). Les os longs ont une structure assez particulière comparativement aux autres os, ils sont séparés en trois structures, soit les épiphyses (les extrémités), les métaphyses (jonction épiphysio-diaphysaire) et la diaphyse (le corps long).

Au niveau de tous les os, on distingue deux formes de tissus osseux, soit l'os trabéculaire (ou spongieux) ou l'os cortical (ou compact) [Figure 1]. Le tout est entouré d'une enveloppe externe; le périoste. La classification en os trabéculaire ou cortical dépend du degré de porosité. L'os spongieux est doté d'une porosité de 30 à 90 % comparativement à 5 à 30 % pour l'os cortical [1]. L'os cortical représente environ 80 % de la masse osseuse et constitue la paroi externe des os plats et de la diaphyse des os longs. Il est constitué par une multitude d'ostéons cylindriques de 200 à 300µM de diamètre alignés parallèlement à la diaphyse. Les ostéons sont composés de lamelles concentriques dans lesquelles on retrouve des fibres de collagène organisées d'une façon ordonnée donnant une résistance mécanique au tissu cortical [1]. Chaque ostéon renferme en son centre un canal de Havers dans lequel circulent des vaisseaux sanguins et lymphatiques et des nerfs permettant un échange métabolique [4, 6]. Le grand nombre d'ostéons ainsi que leur disposition est adaptée pour circonscrire la propagation d'une microcassure dans l'os [7].

D'un autre côté, l'os spongieux ne représente que 20 % du squelette adulte et constitue les épiphyses et les métaphyses des os longs et l'intérieur des os plats et courts. Celui-ci est formé de travées (i.e. trabécules) composées de plusieurs couches de lamelles aplatis disposées selon l'orientation des contraintes mécaniques [3]. Bien que l'os spongieux soit moins abondant, celui-ci se renouvelle cinq fois plus vite que l'os cortical. En raison de la grande surface de contact entre le tissu hématopoïétique et les cellules osseuse, l'os spongieux joue un rôle important dans les échanges métaboliques permettant de contribuer à l'équilibre phosphocalcique. L'os cortical a donc une fonction mécanique tandis que l'os trabéculaire a plutôt une fonction métabolique.

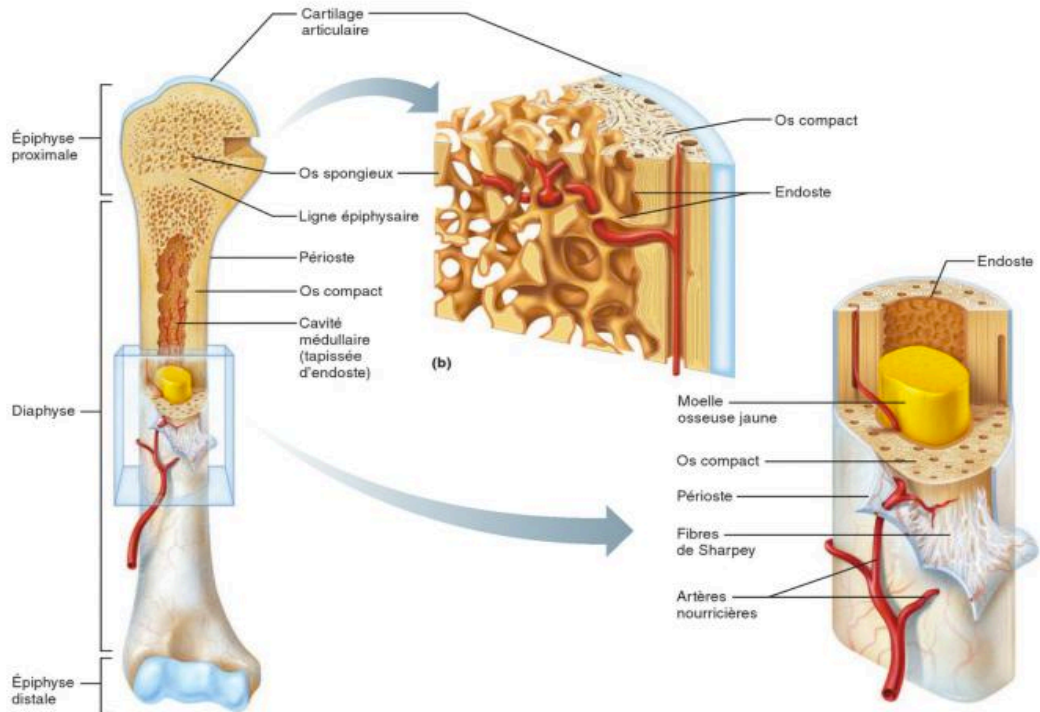


Figure 1 : Structure d'un os long [5]

1.1.1.2 Composition du tissu osseux

Le tissu osseux est hautement spécialisé et est constitué d'une matrice extracellulaire subdivisée en matrice organique (22 %) et en matrice inorganique (69 %) [1]. La matrice organique de l'os est composée de collagène de type I et de protéines non collagéniques, tels la sialoprotéine osseuse, l'ostéocalcine (OCN) et la fibronectine auxquels sont liées la fraction minérale. Les fibrilles de collagène de type I sont synthétisées par les ostéoblastes (Ob) et représentent environ 90 % de la matrice organique. Cette glycoprotéine forme un réseau fibreux avec les protéines non collagéniques, appelé tissu ostéoïde, qui est minéralisé dans un second temps [1]. De plus, cette matrice contient des cytokines ainsi que des facteurs de croissance sécrétés par les Ob qui jouent un rôle fondamental dans la régulation de la minéralisation et du remodelage osseux. La matrice inorganique est la substance minérale de l'os et elle est constituée de cristaux de phosphate de calcium; l'hydroxyapatite (80 %), de carbonate de calcium (14 %), de phosphate de magnésium et de fluorure de calcium (6 %) [8].

Ces minéraux sont en liaison avec le collagène au niveau des espaces intercellulaires et c'est ce dernier qui donne à l'os sa résistance aux sollicitations mécaniques [9].

1.1.1.3 Cellules osseuses

C'est au niveau de la moelle osseuse que les cellules osseuses trouvent leur origine. En effet, c'est elle qui produit les deux grands groupes de cellules souches, soit les cellules hématopoïétiques (HSCs) et les cellules mésenchymateuses (MSCs). Les HSCs sont à l'origine des cellules sanguines et immunitaires dont fait partie la lignée monocytes-macrophages qui est la lignée progénitrice des ostéoclastes (Oc). Les MSCs sont à l'origine des adipocytes, des cellules endothéliales, des fibroblastes, des chondrocytes et des Ob [10]. Il existe quatre types de cellules osseuses : les Oc, les Ob, les ostéocytes et les cellules bordantes ayant chacun un rôle distinct.

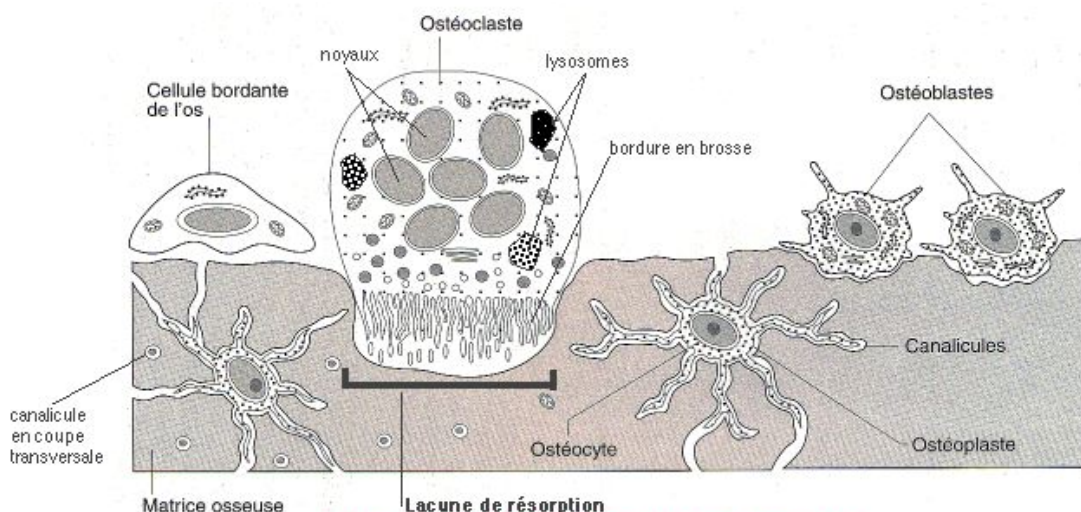


Figure 2 : Schéma des cellules osseuses [11]

1.1.1.4 Les ostéoblastes

Les Ob sont des cellules cuboïdales mononuclées d'environ 20µM de diamètre qui ont comme rôle primaire de former la matrice osseuse par le biais de la sécrétion des composants de cette matrice. Ayant les MSCs de la moelle osseuse comme précurseurs, le développement des Ob suit un processus de différenciation complexe et ordonné contrôlé par l'expression séquentielle de gènes spécifiques participants à plusieurs cascades de signalisation pro-ostéogéniques. Ce processus peut être divisé en quatre étapes; 1) l'engagement 2) la

prolifération 3) la différenciation des cellules souches pluripotentes en Ob fonctionnels et 4) la minéralisation de la matrice osseuse [12] [13]. La première étape de l'engagement des cellules MSCs vers la voie ostéo/chondroprogéniteur a lieu grâce aux voies de signalisation BMPs-dépendantes (*Bone morphogenetic proteins*) et à la cascade Wnt [14]. Les *BMPs* stimulent par la suite la transcription des gènes *osteoblast specific factor 2* (*Osf2*) et *runt-related transcription factor 2* (*Runx2*, également connu sous le nom de *core binding factor a1* *Cbfa1*) [15]. Les BMPs -2, 4, 5, 6 et 7 ont tous un grand effet ostéogénique toutefois, c'est BMP-2 qui est de grande importance dans le développement osseux [16]. En effet, BMP-2 augmente considérablement l'OCN et son expression est nécessaire afin d'induire de façon irréversible la formation osseuse. La perte de celui-ci induit une dysfonction sévère de l'ostéogénèse [16]. La voie de signalisation de Wnt stimule également l'ostéoblastogénèse, mais de plus elle inhibe les facteurs de transcriptions nécessaires (*C/ERB* et *PPAR γ*) pour la différenciation préadipocytaire.

Par la suite, l'étape 2 est caractérisée par une hausse de l'expression de *Runx2*, du collagène de type I et par la synthèse d'histones nécessaires à un niveau élevé de prolifération [12]. *Runx2* est considéré comme étant un chef d'orchestre dans le développement des Ob puisqu'il régule à son tour plusieurs gènes ostéoblastiques primordiaux tels que la sialoprotéine osseuse (*Bsp*) I (également connu sous le nom d'ostéopontine *OPN*) et *BSP-II*, le collagène de type I (*Col1A*) et l'ostéocaline [15]. Au cours de la phase de prolifération, les progéniteurs acquièrent l'activité de la phosphatase alcaline (*ALP*) et entrent dans l'étape de la différenciation des ostéoprogéniteurs en pré-Ob. C'est également à ce stade que les cellules subissent un changement morphologique et deviennent plus larges, cuboïdales et acquièrent l'habileté de sécréter des protéines de la matrice osseuse [12, 15]. À la dernière étape de la maturation, les pré-Ob deviennent des Ob matures sous l'influence de l'*insulin-like growth factor-1* (*IGF1*) et de la prostaglandine E2 (*PGE2*). À ce stade, ils expriment des niveaux élevés d'OCN, de *BSPs* et de *Col1A* et s'incrustent dans la matrice osseuse nouvellement minéralisée.

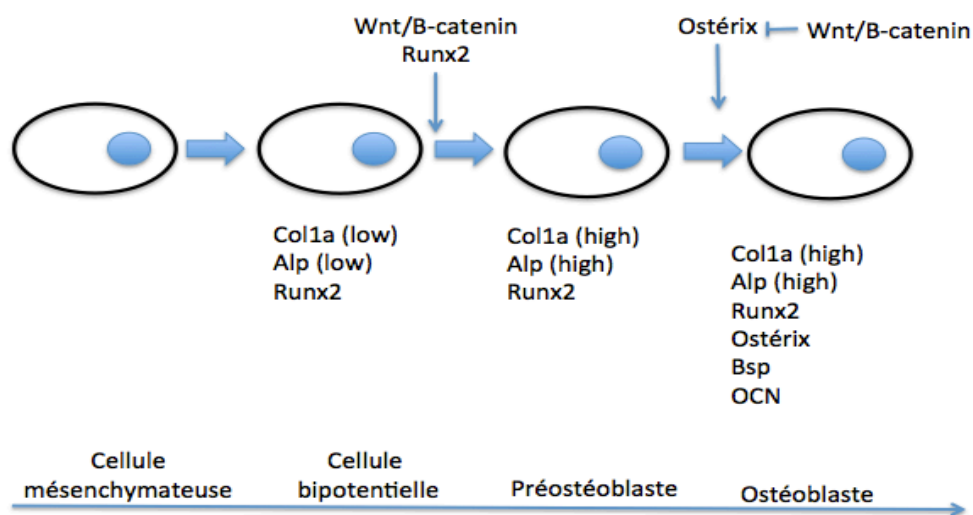


Figure 3: La régulation génique de la différenciation ostéoblastique adaptée de [17]

Les Ob matures sont des cellules dotées d'un cytoplasme basophile riche en organelles impliquées dans la synthèse protéique telles qu'un appareil de Golgi volumineux, un réticulum endoplasmique granuleux abondant ainsi que de nombreuses mitochondries [18]. De plus, elles sont également capables de communiquer ensemble via les jonctions Gap formées par des connexines qui commandent l'activité fonctionnelle des Ob [13]. Tel que mentionné précédemment, ces cellules ont comme rôle principal de former l'os. Ce processus peut être séparé en trois étapes, soit la production et la maturation de l'ostéoïde et finalement par sa minéralisation [10]. La première étape est caractérisée par une grande production de collagène qui est suivie par une étape de minéralisation à un taux égalant le dépôt de l'ostéoïde. Au dernier stade, la synthèse collagénique diminue et la minéralisation continue jusqu'à ce qu'elle soit complète [19].

En plus de son rôle dans le dépôt de l'hydroxyapatite, ces cellules osseuses peuvent réguler la concentration locale du calcium et du phosphate afin de promouvoir la formation de l'hydroxyapatite [15]. En outre, elles gouvernent la production de molécules régulatrices solubles (OPG, RANKL) et de cytokines (M-CSF, $TNF\alpha$, IL-1, IL-6, IL-11) qui agissent au niveau des cellules précurseurs des Oc et jouent un rôle majeur dans l'ostéoclastogénèse, la différenciation ostéoclastique et le contrôle de la résorption osseuse [15]. Suite à une phase

active de formation osseuse, la grande majorité (i.e. environ 65%) des Ob meurent au site de remodelage par apoptose, à l'image des Oc [15], tandis que le reste peut soit se différencier en ostéocyte ou en cellule bordante.

1.1.1.5 Les ostéocytes

Les ostéocytes sont issus des Ob emmurés dans la matrice nouvellement minéralisée et représentent environ 90 % des cellules au niveau de l'os. Ces cellules ont un degré de différenciation supérieur à ceux des Ob puisqu'elles ne forment plus d'os. Ceci explique donc pourquoi, pendant de nombreuses années, la communauté scientifique pensait que ces cellules étaient inactives [20]. Au contraire, il a été démontré que ces cellules étaient primordiales pour l'homéostasie osseuse en agissant comme mécanosenseurs. Chaque ostéocyte est contenu dans une cavité creuse dans la matrice: l'ostéoplaste. Tels les Ob, les ostéocytes peuvent également communiquer entre eux grâce aux jonctions Gap et ils possèdent de nombreux prolongements cytoplasmiques créant un réseau de cellules incrustées, au-delà de l'ostéoplaste, au niveau de la matrice osseuse. Ce réseau élaboré permet donc la transmission de divers changements mécanique et chimique [2]. De ce fait, les ostéocytes ont un certain effet autant sur la synthèse de l'os que sur sa résorption par l'intermédiaire de facteurs spécifiques tels que le *dentin matrix protein* (DMP1), la sclérostine et le *matrix extracellular phosphoglycoprotein* (MEPE). DMP-1 est d'ailleurs reconnu pour son effet promoteur sur la minéralisation et l'homéostasie minérale. D'un autre côté, MPE agit comme inhibiteur de minéralisation avec le facteur sclérostine qui inhibe la voie Wnt nécessaire à la formation osseuse [12].

1.1.1.6 Les cellules bordantes

Les cellules bordantes séparent le tissu osseux de la moelle osseuse et sont issues d'ostéocytes qui s'aplatissent pour devenir des cellules quiescentes. Ces cellules peuvent se différencier en Ob actifs sous l'action de certains stimuli comme la parathormone (PTH). Or, leurs rôles exacts ne sont pas encore élucidés [21].

1.1.1.7 Les ostéoclastes

Les Oc sont des cellules multinucléées volumineuses (~100µm de diamètre) dont la différenciation se fait à partir de monocytes qui se fusionnent pour former des cellules

plurinucléées. Ce processus est sous le contrôle de trois facteurs de différenciation soit le *Macrophage colony stimulating factor* M-CSF, le *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand* (RANKL) et son antagoniste, l'ostéoprotégérine (OPG). Le M-CSF est sécrété par les Ob et est primordial pour le maintien des monocytes-macrophages tandis que le RANKL est sécrété principalement par les cellules stromales et permet la différenciation de ces précurseurs en Oc. En effet, l'interaction du RANKL avec son récepteur RANK exprimé à la surface des cellules précurseurs mène à une maturation des Oc [10]. Cette différenciation par RANKL ne peut se faire qu'en présence de M-CSF. Elle peut être stoppée grâce à la protéine soluble OPG, aussi sécrétée par les Ob, qui détient une forte affinité pour le RANKL et bloque l'interaction RANK-RANKL. De ce fait, l'OPG module négativement le processus d'ostéoclastogénèse.

Ces cellules jouent un rôle primordial dans l'os en remodelage et en formation puisqu'elles sont responsables de la résorption osseuse. L'Oc mature est doté d'une bipolarité phénotypique et fonctionnelle qui est essentielle à cette fonction de résorption. On distingue donc un pôle apical qui est en contact avec la matrice osseuse et qui présente une membrane plissée appelée bordure en brosse qui accroît la surface de contact de la cellule et permet les échanges métaboliques. C'est à ses côtés qu'on retrouve des filaments d'actine, les podosomes, qui s'accumulent formant la zone de scellement qui renferme la lacune de résorption [1]. De plus, c'est au niveau de cette membrane que se trouve une pompe à proton H^+ -ATPase qui rend possible la déminéralisation osseuse, la première étape du processus de résorption, par acidification du compartiment osseux. Ce processus se poursuit par la dégradation enzymatique de la matrice osseuse organique par l'action des enzymes lysosomiales dont les plus connues sont la protéase à cystéines cathepsine K et la phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP) [10]. Ces fonctions particulières aux Oc sont possibles grâce au cytoplasme qui est très riche en mitochondries. Ces dernières sont une source d'ATP qui approvisionne la pompe à protons et l'activation des enzymes lysosomiales. C'est grâce à ce pôle que le phénomène de résorption est possible. Le pôle basolatéral pour sa part, sert au maintien de l'équilibre électrochimique de l'Oc par la coordination de pompes à ions électrogènes, de canaux et d'échangeurs ioniques [22].

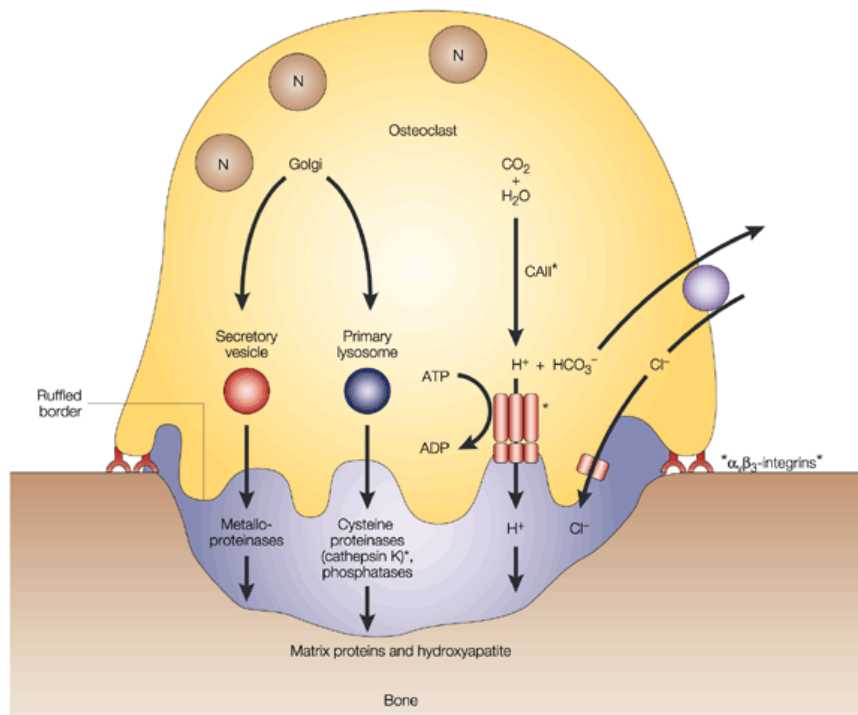


Figure 4: Schéma d'un ostéoclaste [23]

En outre, l'Oc fonctionne de manière cyclique ayant une phase migratoire suivie d'une phase de résorption active. Ainsi, la durée de vie moyenne de ces cellules chez l'humain est d'environ 2 semaines [15]. Elles subissent par la suite une mort par apoptose pour finalement être rapidement phagocytées par des cellules mononucléées, telles que les macrophages, qui vont lisser le fond des lacunes de résorption [24].

1.1.2 Remodelage osseux

La formation et la croissance osseuse débutent dès la 6e semaine de vie foetale et continue après la naissance jusqu'à environ l'âge de 25-30 ans. Celle-ci est suivie par une perte inévitable et progressive de la densité osseuse qui débute autour de la cinquantaine et qui peut s'accélérer significativement avec le temps.

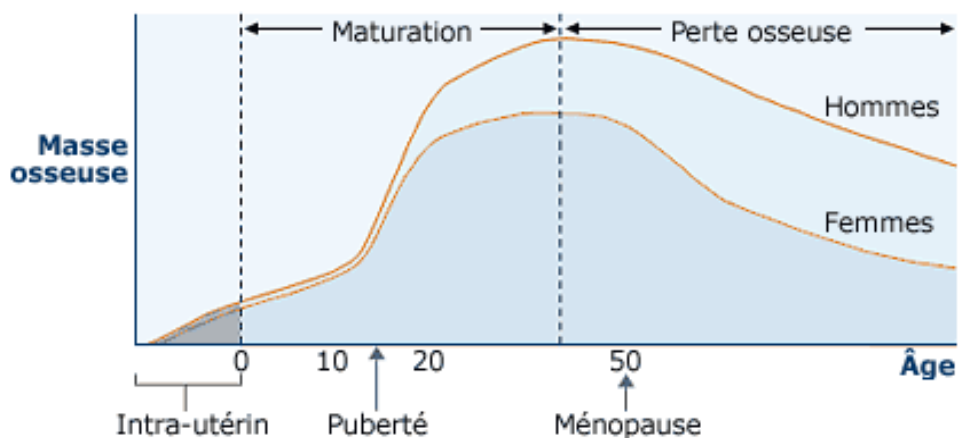


Figure 5: Évolution de la masse osseuse au cours de la vie [25]

En effet, l'os est un tissu vivant qui suit constamment un cycle de formation et de destruction connu sous le nom de remodelage osseux. Celui-ci est un processus local effectué par des unités de remodelage osseux formées d'une collaboration entre les Ob et les Oc [26, 27]. On estime qu'à chaque année environ 5% de la masse du squelette, 25% de l'os trabéculaire et 4% de l'os cortical, est constamment remodelée par environ 2 millions d'unités de remodelage osseux [28]. Ainsi, ces cycles de résorption/formation sont primordiaux pour le maintien de l'intégrité de la structure osseuse et afin de contrôler l'homéostasie phosphocalcique de l'organisme. De plus, le remodelage osseux sert à la réparation des microfractures et dépend notamment des stress et contraintes imposées aux os [26, 27]. Chaque cycle dure environ 4 mois où la phase de formation est prédominante [29]. Cinq phases se succèdent au cours du remodelage osseux; la phase d'activation, de résorption, d'inversion, de formation et de

quiescence [30] telle que démontré à la Figure 6.

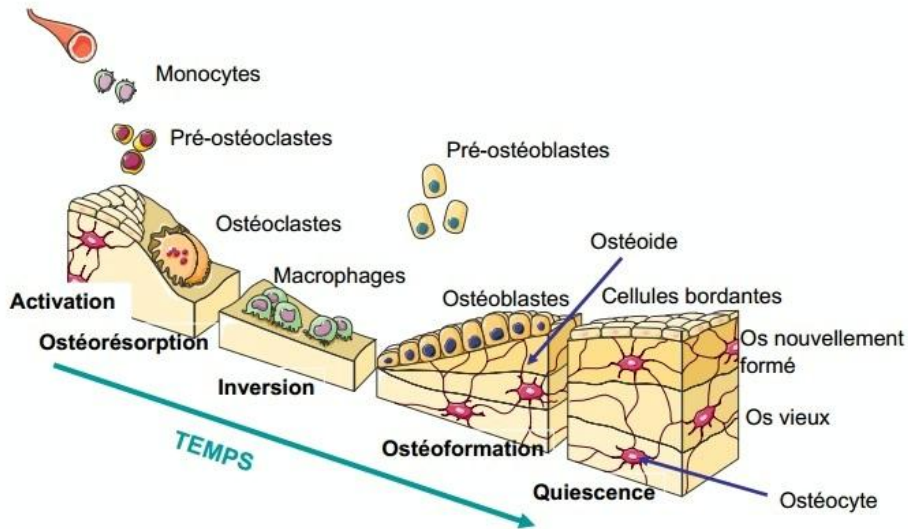


Figure 6: Cycle de remodelage de l'os [31]

L'os est constamment exposé aux contraintes de compression qui induisent une accumulation de dommages sous la forme de microfissures. Les cellules ostéocytaires mécanosensibles sont stimulées par ce genre de déformation mécanique et ce sont elles qui activent le processus de remodelage. En effet, on croit qu'une fois que les déformations mécaniques dépassent un certain seuil, les ostéocytes envoient le signal nécessaire pour la différenciation des cellules souches en Ob ou en Oc [21]. Bien que l'effecteur principal de la phase d'activation n'est toujours pas élucidé, il a été suggéré que ce processus est enclenché par l'apoptose des ostéocytes [20]. À la phase d'activation, les cellules bordantes captent ce signal et se rétractent rendant la surface osseuse accessible aux pré-Oc [48]. De plus, c'est pendant cette phase qu'on note une migration des pré-Oc provenant de la circulation et se dirigeant vers le site ciblé pour la résorption. C'est également à ce stade que l'interaction des Ob avec les précurseurs d'Oc (OCP) est primordiale puisqu'elle permet leur différenciation en Oc matures permettant ainsi à la phase de résorption de débuter. À cette étape, les cellules ostéoclastiques sécrètent des ions d'hydrogène, des enzymes lysosomales ainsi que la cathepsine K pour dégrader la matrice osseuse minéralisée. C'est ainsi que des zones creuses, nommées les lacunes de Howship, sont formées [29]. Le cycle de remodelage osseux se poursuit avec la phase d'inversion caractérisée

par l'apoptose des cellules ostéoclastiques et leur remplacement par des cellules mononuclées telles que les monocytes, les ostéocytes et les pré-Ob qui vont préparer la surface osseuse pour la formation osseuse et vont produire les signaux nécessaires pour la différenciation et la migration des Ob [19]. Ainsi les Ob se différencient localement et apposent les lamelles de tissu ostéoïde sur les lacunes de Howship, celles-ci seront minéralisées environ 30 jours plus tard. Le processus de minéralisation prend fin environ 90 et 130 jours plus tard pour l'os trabéculaire et l'os cortical respectivement [19]. À la fin de cette synthèse, les cellules osseuses entrent en phase de repos jusqu'au prochain cycle de remodelage; il s'agit de la phase de quiescence. À la fin du cycle, la quantité d'os formée devrait être équivalente à la quantité d'os résorbée.

1.1.2.1 Facteurs impliqués dans le métabolisme et le remodelage osseux

Les mécanismes cellulaires de remodelage osseux sont soumis à de multiples influences endogène et exogène. Plusieurs facteurs sont impliqués dans la modulation de l'activité des cellules osseuses dont les plus importants sont les facteurs hormonaux ainsi que locaux et les contraintes mécaniques [32].

1.1.2.2 Régulation systémique

La PTH est sécrétée par les glandes parathyroïdes et demeure l'un des régulateurs calciques les plus importants. Considérée hypercalcémiant, cette hormone stimule la résorption osseuse et augmente la réabsorption tubulaire rénale de calcium [32]. Par contre, les actions de la PTH sont complexes puisqu'elle peut également stimuler la formation osseuse. L'action de la PTH est médiée par le récepteur PTHR1 et son action dépend de son mode d'administration. Une exposition continue à la PTH stimule une action osseuse catabolique tandis qu'une exposition intermittente résulte en une action osseuse anabolique [1]. Ceci s'explique par le fait qu'au niveau des cellules osseuses, ce ne sont pas les mêmes gènes qui sont régulés dans les deux modes d'administration [1].

La forme bioactive de la vitamine D synthétisée par les reins, la 1,25 (OH)₂D, joue également un rôle important puisqu'elle exerce un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de la PTH. En plus de stimuler l'absorption intestinale du calcium, cette hormone aurait un effet direct sur les cellules osseuses en stimulant l'expression de nombreux gènes ostéoblastiques tels que la *Alp*,

l'OCN et le collagène de type I en favorisant ainsi la formation osseuse [33]. Néanmoins, tout comme la PTH, la vitamine D peut également promouvoir la résorption osseuse. En effet, au détriment (temporaire) de la masse osseuse, cette hormone a un effet catabolique sur l'os dans le cas d'une hypocalcémie sévère afin de maintenir l'homéostasie calcique [34].

Finalement, la calcitonine, quant à elle, est sécrétée par la glande thyroïde et inhibe l'activité des Oc tout en augmentant la calciurie.

1.1.2.3 Régulation locale

Les facteurs locaux sont essentiellement produits par les cellules du microenvironnement osseux. En effet, le système de signalisation le plus important est celui du OPG/RANKL/RANK décrit à la section 1.1.1.7. Brièvement, RANKL se lie à son récepteur RANK sur la surface des cellules préostéoclastiques et promeut leur différenciation en Oc. En ce qui a trait à l'OPG, il est considéré comme un récepteur soluble «leurre» de RANKL, elle agit comme inhibiteur endogène en bloquant la liaison de RANKL avec son récepteur RANK et conséquemment, en prévenant le processus de différenciation ostéoclastique [35].

De plus, certaines cytokines ont des effets cruciaux sur ce même système en jouant sur la différenciation et l'activation des cellules immunitaires et notamment des Oc et sur le chimiotactisme [36]. Les cytokines telles que le TNF, l'IL-1 et l'IL-17 sont de forts inducteurs de l'ostéoclastogenèse tandis que l'IL-12, l'IL-23 et IFN- γ agissent plutôt comme des suppresseurs. De ce fait, le niveau d'expression de ces cytokines dans le microenvironnement inflammatoire détermine leur capacité destructrice de l'os [36]. Pour cette raison, les maladies inflammatoires chroniques telles que la maladie de Crohn, l'asthme, la maladie pulmonaire obstructive chronique, la néphrite sont souvent associées avec une perte osseuse [37].

D'autre part, le *transforming growth factor* (TGF- β) est présent en abondance dans la matrice osseuse sous sa forme inactive [35]. Cette cytokine est déposée dans la matrice au moment de la formation osseuse par les Ob. Celle-ci est ensuite libérée et activée au moment de la résorption osseuse par les Oc [35]. Sa libération activerait également le recrutement des Ob agissant ainsi comme un facteur de couplage du remodelage osseux [35]. De plus, ce facteur est indispensable pour la différenciation ostéoblastique et la prolifération des cellules ostéoprogénitrices.

1.1.3 La qualité osseuse

La structure osseuse est influencée par le patrimoine génétique et détermine la charge mécanique qu'elle peut tolérer. Par contre, la charge mécanique a également un effet sur la structure osseuse lui donnant une résistance aux endroits où ils sont le plus sollicités [7]. La résistance osseuse est grandement influencée par la densité minérale de l'os et la quantité osseuse, or celle-ci dépend de plusieurs paramètres qui reflètent la qualité de l'os, dont le niveau de remodelage osseux, la microarchitecture et l'accumulation de microfractures [38].

Le modelage et le remodelage osseux sont primordiaux tout au long du développement osseux. Ces deux processus influencent l'architecture osseuse en modifiant la longueur et l'épaisseur de l'os, mais également la structure interne par l'épaississement ou l'amincissement de l'os cortical et trabéculaire. Pendant la croissance, le volume osseux qui est résorbé est moindre que le volume osseux nouvellement synthétisé permettant ainsi une augmentation de la masse osseuse. Par contre, lorsque le squelette atteint sa maturité, la résorption et la formation osseuse sont plus ou moins égales. Au moment de la ménopause, l'arrêt de la sécrétion des estrogènes mène au déséquilibre du processus de remodelage en faveur de la résorption osseuse, ce qui induit une fragilité osseuse et, de ce fait, une augmentation du risque de fractures [7].

1.2 La moelle osseuse

1.2.1 Structure macroscopique

La moelle osseuse (MO) est un tissu complexe qui est situé dans le canal diaphysaire des os longs et entre les travées de l'os spongieux des os courts et des os plats de l'organisme [39]. En effet, on distingue deux sortes de moelle soit la moelle rouge et la moelle jaune. La moelle rouge a comme fonction principale la formation des plaquettes, des globules rouges ainsi que des cellules immunitaires; c'est donc à ce niveau qu'a lieu l'hématopoïèse. La moelle jaune, quant à elle, est un lieu de stockage du tissu adipeux et se trouve principalement dans la diaphyse des os [40]. Elle est quiescente, mais conserverait sa capacité de reprendre au besoin son activité hématopoïétique [41]. À la naissance, la MO est quasiment exclusivement

hématopoïétique avec très peu d'adipocytes. Par contre, chez l'adulte il y a une modification de la proportion de la moelle jaune et de la moelle rouge qui sont normalement partagées à 50:50 [42]. La cellularité est dépendante de l'âge et peut varier sous des conditions pathologiques; on parle d'hypercellularité lorsque la moelle rouge occupe plus de 70% et d'hypocellularité lorsqu'elle occupe moins de 30% des cellules totales dans la cavité médullaire. Les cellules produites dans la MO vont entrer dans la circulation sanguine et vont se distribuer dans tout l'organisme [35].

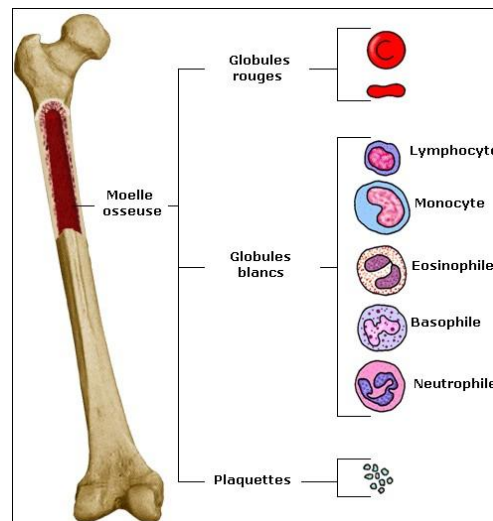


Figure 7: Anatomie de la moelle osseuse [43]

1.2.2 L'hématopoïèse

L'hématopoïèse est la formation des cellules sanguines qui se distinguent en trois types cellulaires soit les érythrocytes, les plaquettes et les leucocytes. Un adulte en bonne santé produit approximativement 10^{11} - 10^{12} nouvelles cellules sanguines par jour. Toutes les cellules du sang dérivent d'un même type de cellule appelée cellules souches hématopoïétiques (CSH) [44]. Même si elles ne représentent que 0,05% des HSCs, celles-ci ont une propriété fondamentale d'autorenouvellement qui permet de maintenir un *pool* de cellules souches dans la MO. De ce fait, la cellule souche se divise en deux cellules filles : la première reste indifférenciée, mais avec les mêmes propriétés que la cellule-mère tandis que l'autre se différencie en cellule progénitrice. À ce stade, les cellules progénitrices ont perdu la capacité d'autorenouvellement et s'engage dans une lignée cellulaire particulière soit la lignée myéloïde

ou la lignée lymphoïde [44]. Les cellules progénitrices de la lignée myéloïde mènent à la formation des érythrocytes, des neutrophiles, des éosinophiles, des basophiles, des monocytes, des mastocytes ainsi que des mégakaryocytes. D'un autre côté, les cellules progénitrices de la lignée lymphoïde génèrent les cellules *natural killer* (NK), les cellules B et les cellules T [44]. L'hématopoïèse se fait de façon continue; les cellules du sang matures sont égales à la perte de celles-ci. Ce processus a lieu principalement au niveau de la MO. Par contre, une hématopoïèse extramédullaire au niveau du foie et de la rate est possible en cas de certaines maladies (i.e.leucémie, lymphome, myélofibrose) [35]

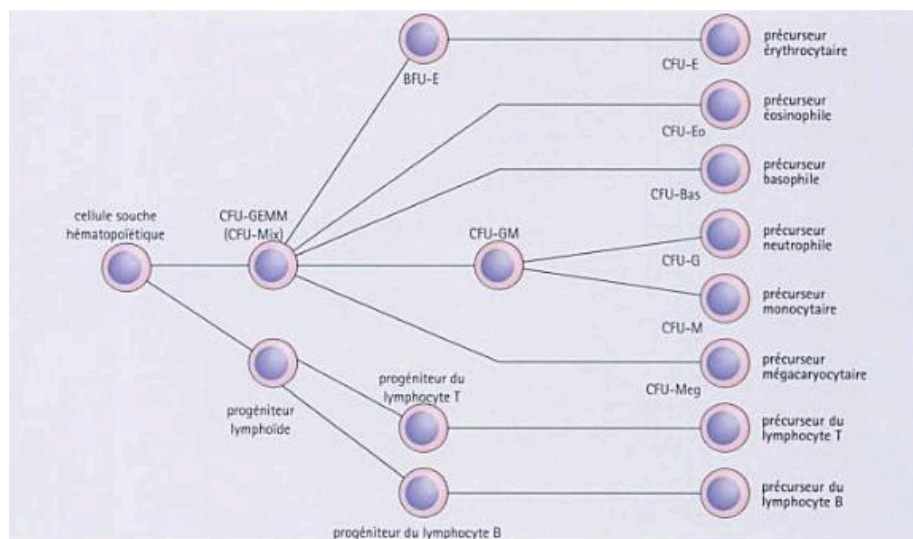


Figure 8: La différenciation des cellules souches hématopoïétiques [41]

Les phases de prolifération et de différenciation de l'hématopoïèse sont sous le contrôle de nombreux facteurs de croissance appelés cytokines hématopoïétiques [27]. En effet, dans la MO ces signaux proviennent du réseau de MSCs qui incluent les adipocytes, les Ob, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les macrophages [45]. Ces cellules sont primordiales puisque ce sont elles qui créent un micro-environnement inducteur de la différenciation hématopoïétique permettant également la quiescence et la production de facteurs nécessaires pour le nichage tels que le CXCL12 aussi appelé *stromal-derived factor 1 (SDF-1)* [35]

1.2.2.1 La niche hématopoïétique

L'importance de la niche hématopoïétique (i.e. microenvironnement médullaire) dans le maintien des cellules HSC a été proposée pour la première fois par Ray Schofield en 1978

[46]. Depuis cette découverte, il est clair que le microenvironnement où résident ces cellules assure le maintien de celui-ci. Le microenvironnement médullaire désigne l'ensemble formé par la matrice extracellulaire (collagène, fibronectine, laminine, protéoglycanes), par les MSC et par les substances qu'elles produisent (cytokines, molécules d'adhésion) [47]. Celui-ci régule la dormance, la survie, la non-différenciation ainsi que la mobilisation des HSC en dehors de la niche en réponse à des signaux externes variés, constituant ainsi un système hautement dynamique [48]. Encore à ce jour, la situation et la composition de cette niche sont très mal connues. On dit qu'il existe deux types de niches hématopoïétiques. Le premier type est localisé près de l'endoste (i.e. la couche de tissus qui tapisse la cavité interne de l'os) à proximité de la moelle osseuse dont la lignée ostéoblastique en est la principale composante et nommé la niche ostéoblastique [49]. Le deuxième type de niche hématopoïétique est situé en région périvasculaire à proximité des capillaires de la moelle osseuse et est appelé niche endothéliale [49].

1.2.2.2 La niche ostéoblastique

De plus en plus d'études supportent que les Ob sont impliqués de manière importante dans la régulation et le maintien des HSC. En effet, une série d'études ont démontré que les Ob humains pouvaient supporter l'hématopoïèse dans un système de culture *ex vivo* [49]. L'équipe de Dr.Taichman fut la première à découvrir que les Ob participent directement à l'hématopoïèse en produisant du *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF), du *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) et de l'interleukine-6 (IL-6)[50]. Leurs études *in vitro* ont ouvert la porte à l'importance des Ob dans le microenvironnement médullaire [49]. Trois études *in vivo* sur des modèles murins *knock-out* différents ont renforcé ce lien. L'étude de Calvi *et al.* [49] démontre d'ailleurs que les souris dont le récepteur de PTH (PPR) a été génétiquement déplété présentent une augmentation du nombre d'Ob dans la MO et parallèlement une augmentation du nombre de HSC. Par la suite, l'équipe de Zhang *et al.* [49] a utilisé une souris dont le récepteur type IA de BMP (BMPRIA), présent à la surface des Ob, a été inactivé. Ils ont remarqué que ces souris présentaient une formation anormale de l'os trabéculaire qui pourrait être expliqué par une prolifération excessive et une différenciation anormale des progéniteurs ostéoblastiques ou une absence d'apoptose ostéoblastique. Autre donnée intéressante, l'augmentation du nombre d'Ob au

niveau de l'os trabéculaire corrèle avec une augmentation du nombre d'HSC. La troisième étude de Visnjic *et al.* a démontré que dans un modèle murin dont le promoteur du collagène de type I avait été déplété, une diminution du nombre d'Ob engendrait une diminution de la cellularité de la MO. En résumé, les Ob semblent bel et bien exercer un contrôle non-négligeable sur la composition et le nombre de cellules retrouvées dans la MO.

1.3 Le CFTR

1.3.1 Le gène

Le gène *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) a été identifié en août 1989 par une équipe mixte de chercheurs canadiens et américains [51]. Ce gène code pour la protéine CFTR et est localisé sur le chromosome 7 au niveau du locus q31.2. Celui-ci comprend 27 exons répartis sur 250 kilobases d'ADN [49].

1.3.2 La protéine

La protéine CFTR appartient à la superfamille des protéines *ATP-binding cassette* (ABC) utilisant l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP pour véhiculer notamment du chlore contre un gradient de concentration. La structure de la protéine inclut 5 domaines, dont deux domaines intracellulaires hydrophiles NBD1 et NBD2 (*nucleotide binding domain*) qui sont des sites de fixation de l'ATP, 2 domaines hydrophobes transmembranaires TM1 et TM2 ainsi qu'un cinquième domaine régulateur (R) sur la face cytosolique qui contient plusieurs sites de phosphorylation par les protéines kinases C et A [52]. Cette protéine forme un canal transmembranaire dont l'activité est dépendante de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) sur la membrane apicale des cellules épithéliales et sur de multiples cellules non épithéliales du coeur, du cerveau et d'autres tissus tels que le tissu osseux [49]. De plus, son niveau d'expression est variable selon les tissus et le stade du développement [53].

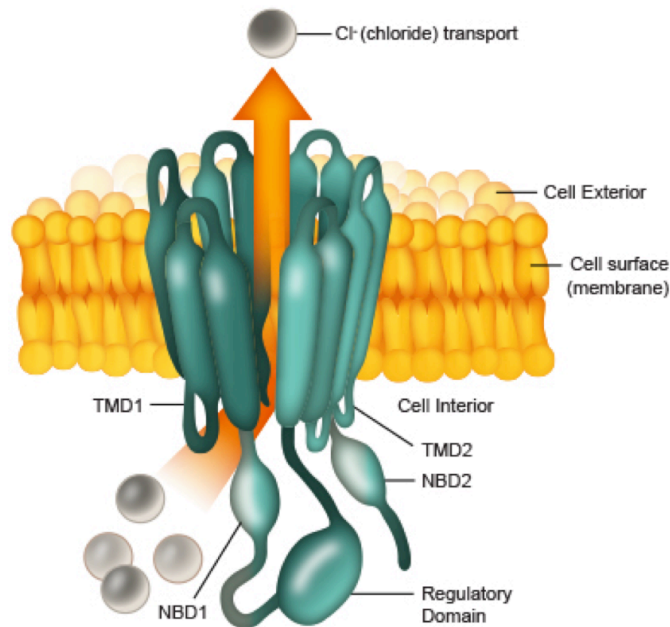


Figure 9 : Structure du CFTR[54]

1.3.2.1 Biosynthèse

Comme toutes les protéines membranaires, l'assemblage de la protéine CFTR s'amorce avec la synthèse de son précurseur, la forme A, au niveau du réticulum endoplasmique (RE) où elle est glycosylée pour donner la forme immature (forme B). Lorsque mesurée en gel d'électrophorèse, celle-ci a un poids moléculaire de 140 kDa et contient des chaînes oligosaccharidiques sensibles à l'endoglycosidase H. Suite à une maturation complexe de la N-glycosylation au niveau de l'appareil de Golgi on retrouve la forme mature, la forme C ayant un poids moléculaire d'environ 170-180 kDa [49]. Par contre, ce processus est peu efficace. En effet seulement 30 % des précurseurs nouvellement synthétisés seront transformés en molécules matures. De plus, seule la protéine mature pourra atteindre la surface apicale pour former un canal anionique.

1.3.2.2 Fonction

La protéine CFTR exerce plusieurs fonctions. Comme mentionné précédemment, elle est avant tout un canal chlorure présent sur les membranes apicales des cellules épithéliales qui favorise le passage des ions chlorure (Cl^-) et bicarbonate (HCO_3^-). La liaison à l'ATP est nécessaire afin que le canal s'ouvre et soit actif [49]. De plus, le CFTR régule le passage des électrolytes en régulant, entre autres, l'activité de l'*epithelial Na⁺ channel* (ENaC) [55]. Dans les intestins et le pancréas le CFTR joue un rôle dans la sécrétion d'électrolytes. Dans les glandes sous-muqueuses des voies aériennes, le CFTR transporte le HCO_3^- en plus du Cl^- et permet un maintien de la concentration ionique, ce qui joue un rôle important dans la sécrétion de liquide de périciliaire (PCL) afin d'humidifier le mucus sécrété par ces cellules [56]. Or, au niveau des canaux excréteurs des glandes sudoripares le CFTR participe à l'absorption de ces électrolytes. De ce fait, le CFTR joue un rôle primordial dans le transport du NaCl transepithélial, le maintien de la concentration ionique et les échanges fluidiques [57].

D'autre part, au niveau de la membrane apicale, le CFTR fait partie d'un assemblage multiprotéique [58]. Les trois derniers acides aminés (la thréonine, l'arginine et la leucine) permettent une association avec des protéines dotées d'un domaine PDZ. Ce site est impliqué dans de nombreuses interactions dont celle avec le *CFTR Associated Ligand* (CAL), le *Na⁺-H⁺ Exchange-Regulatory Factor* (NHERF1), *CFTR Associated Protein 70* (CAP70) et le *Intestinal and Kidney Enriched PDZ Protein* (IKEPP) [59]. Ces interactions favorisent l'activation du CFTR par l'entremise d'une augmentation de l'AMPc intracellulaire et ainsi une phosphorylation PKA-dépendante [49]. De ce fait, Kunzelmann et al. [60] suggèrent que le CFTR agirait comme un «hub» qui permet à la cellule de réagir au stress cellulaire. Son absence pourrait donc venir dérégler ce complexe multiprotéique et mener à l'altération de fonctions cellulaires autres que ses rôles classiques dans le transport des ions.

1.4. La fibrose kystique

1.4.1 Définition et prévalence

La fibrose kystique (FK), ou mucoviscidose, est une maladie autosomique récessive reliée à des mutations du gène *Cftr*. Chaque année au Québec, une cinquantaine de nouveaux cas de fibrose kystique (FK) sont diagnostiqués chez les enfants et on estime qu'un enfant sur 3 600 né au Canada est atteint de FK [51, 60]. Bien que l'année 2014 a marqué le 25^e anniversaire de la découverte du gène CFTR [62], cette maladie demeure toujours incurable. Toutefois, depuis cette découverte, les connaissances sur la FK n'ont cessé de progresser. En effet, l'espérance de vie des patients FK est passée d'un âge médian de 25 ans en 1987 à 37 ans en 2008 [49]. Ceci démontre clairement un prolongement de vie qui corrèle avec les progrès liés à la prise en charge thérapeutique des patients [61]. Parallèlement à la moyenne d'âge qui continue d'augmenter, on relève qu'en 2014 près de 60 % des personnes atteintes de la FK au Canada sont des adultes et que ceux-ci présentent un âge médian de survie de 50,9 ans [51, 60]. Une variété de facteurs environnementaux, physiologiques et génétiques ont un impact significatif sur la progression et la sévérité de la FK [49]. Plusieurs études ont également constaté qu'il y aurait un effet du sexe qui affecterait le niveau de sévérité de cette maladie; soit le *cystic fibrosis gender gap* [63]. En effet, les femmes seraient plus affectées que les hommes. Elles semblent être plus souvent touchées par des infections pulmonaires plus graves, une inflammation exagérée et un statut nutritionnel déséquilibré. Ceci suggère donc qu'il pourrait y avoir une implication hormonale et les estrogènes sont d'ailleurs pointés du doigt comme étant un facteur pathogénique expliquant cet écart [49].

1.4.2 Étiologie

1.4.2.1 Les mutations du gène CFTR

À ce jour, plus de 2002 mutations distinctes ont été répertoriées dans le *cystic fibrosis mutation database* [64]. Celles-ci sont regroupées en six classes selon le niveau d'atteinte de la protéine. De ces 2002 mutations, seulement 20 d'entre elles ont une fréquence plus de 0.1 % parmi la population des patients FK; 80 % des mutations se retrouvent parmi les 6 classes identifiées [49]. Les mutations de classe I, II et III du gène *CFTR* font partie des

phénotypes les plus sévères de la FK [65]. En effet, les mutations de classe I causent un signal stop prématuré empêchant la synthèse du CFTR ou encore menant à la synthèse d'une protéine tronquée et très instable qui se fait rapidement dégrader au niveau du RE [65]. Suite à la synthèse de la protéine dans le ribosome, le CFTR subit plusieurs étapes de maturation dans le RE et dans l'appareil de Golgi avant que celui-ci soit redirigé vers la membrane apicale de la cellule. Ce processus est aussi défectueux dans le cas des mutations de classes II, dont la mutation Delta F508 (Δ 508) qui est responsable de 70 % des cas de mucoviscidose. Le CFTR- Δ F508 est retenu dans le RE puis dégradée au lieu de se rendre à l'appareil de Golgi pour y être glycosylé. Cette mutation entraînerait le mauvais repliement du canal et donc, une déstabilisation globale de la structure quaternaire de la protéine [66]. Le résultat net de ces deux classes de mutations est une absence quasi-totale de la protéine au niveau de la membrane apicale [67]. De leur côté, les mutations de classe III sont caractérisées par le défaut du mécanisme d'ouverture et de fermeture du canal CFTR. En effet, la liaison et l'hydrolyse de l'ATP au niveau des NBD1 et NBD2 nécessaire pour l'activation du canal n'ont pas lieu. Le canal se rend donc à la membrane apicale, mais il n'est pas fonctionnel [66]. Les mutations de type IV sont des mutations faux sens situées au niveau des segments des domaines transmembranaires qui sont primordiaux à la formation du pore ionique. Ceci résulte à la formation d'une protéine correctement positionnée au niveau de la membrane, mais présentant une conductance réduite au chlore [67]. Dans le cas des mutations de classe V, c'est la stabilité de l'ARNm qui est affectée. Ces dernières incluent également des mutations dans le promoteur et des mutations modifiant l'épissage alternatif ou provoquant une synthèse inefficace de la protéine. Finalement, les mutations de classe VI conduisent à une réduction de la stabilité de la protéine CFTR au niveau de la membrane plasmique. En effet, la protéine se rend à la membrane, mais elle est rapidement dégradée. Ceci est dû à une délétion de 70 à 100 paires de bases au niveau du domaine C terminal du CFTR [66]. Les mutations des classes IV, V et VI ont été associées à un phénotype plus léger de la maladie [67].

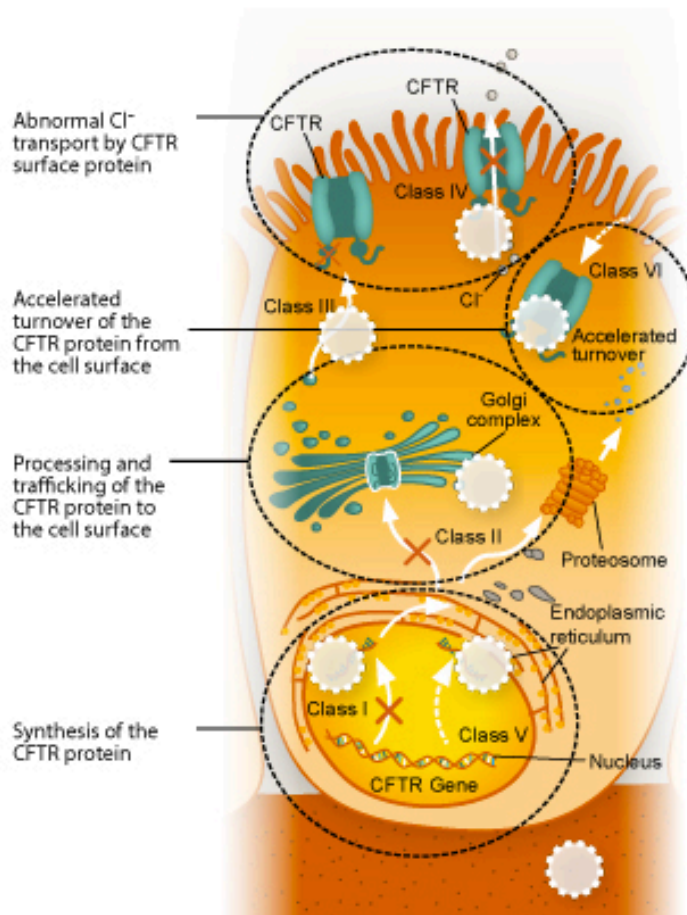


Figure 10 : Classes de mutations du CFTR [54]

1.4.3 Symptômes

1.4.3.1 Atteintes pulmonaires

La manifestation clinique considérée la plus grave chez les patients FK est l'atteinte pulmonaire puisqu'elle est la cause majeure de morbidité et mortalité des patients. Le dysfonctionnement du CFTR, et le déséquilibre de transport de Na⁺ et de Cl⁻, entraînent surtout une baisse du volume périciliaire, ce qui rend difficile la clairance muco-ciliaire. Ce mucus visqueux s'accumule et tapisse les parois des voies aériennes créant ainsi un milieu propice à la colonisation bactérienne tel que le *Staphylococcus aureus*, l'*Haemophilus influenzae* et le *Pseudomonas aeruginosa* [66]. La première ligne de défense du système immunitaire contre ces infections est les neutrophiles. Ces cellules sont rapidement recrutées aux poumons afin de combattre l'infection. Ceci est possible grâce à leur capacité à

phagocyter les microorganismes et à leur capacité de générer des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) [68]. Des protéases telles que l'élastase (*neutrophil elastase*), la cathepsine, les métalloprotéases (MMP-8 et MMP-9) ainsi que plusieurs autres substances antimicrobiennes sont également produits pour la destruction bactérienne. Par contre, même si les neutrophiles contribuent grandement à combattre ces infections, la réponse inflammatoire excessive, les protéases neutrophiliques et les radicaux libres qu'ils sécrètent sont impliqués dans un remodelage des voies aériennes et des lésions épithéliales occasionnant une destruction irréversible des tissus pulmonaires.

D'ailleurs, 80 à 95 % des patients FK succombent à une insuffisance respiratoire conséquemment aux infections bactériennes chroniques et au niveau d'inflammation exagérée des voies aériennes [69].

1.4.3.2 Atteintes gastro-intestinales

Les symptômes gastro-intestinaux de la maladie de la FK sont les manifestations extrapulmonaires les plus importantes [70]. La protéine CFTR est exprimée au niveau apical de l'épithélium des intestins, des canaux pancréatiques et du système biliaire où elle régule la sécrétion de chlore, d'eau et de bicarbonate. L'incidence des manifestations gastro-intestinales dépend du génotype, de l'âge du patient et du niveau d'atteinte du pancréas [70]. Le premier symptôme de la FK est l'iléus méconial et se présente chez 10 à 20 % des nouveau-nés FK [70]. Il s'agit d'une occlusion intestinale secondaire à un épaississement du méconium chez le nourrisson. Cette obstruction intestinale peut survenir également chez l'adulte. Le syndrome de l'occlusion distale de l'intestin (*DIOS*) se présente quant à lui chez 16-20% des patients adultes FK [70]. De plus, tout comme dans les poumons, l'absence de CFTR cause une déshydratation et un épaississement du mucus et celui-ci s'accumule le long du tractus intestinal ce qui ralentit le transit intestinal et peut empêcher l'absorption optimale des nutriments en agissant comme une barrière physique.

Dès la naissance, les patients FK démontrent des troubles gastro-intestinaux qui s'aggravent avec l'âge. Il est rapporté que les patients porteur des mutations du gène CFTR de classe I à III, c'est-à-dire plus de 85% des patients FK, souffrent d'une insuffisance pancréatique tandis que les porteurs des mutations de la classe IV sont dits "suffisants

pancréatiques". Des poussées de pancréatite peuvent être observées chez ces patients [71]. En effet, les sécrétions exocrines pancréatiques chez ces patients ont un pH, un volume ainsi qu'une quantité de bicarbonates plus basse que la normale causant une obstruction des canaux sécréteurs ainsi qu'une diminution du déversement des enzymes pancréatiques nécessaires à la digestion des protéines et des lipides. Il en résulte une malabsorption des graisses, une stéatorrhée, soit la présence de lipides dans les selles, et une carence en vitamines liposolubles (A, D, E et K) et en acides gras essentiels [70].

En plus des anomalies pancréatiques, les canaux biliaires dans le foie peuvent être affectés. En effet, une pathologie hépatique se présente dans 30% des cas des patients atteints de FK et se développe généralement avant l'adolescence [72]. L'absence du CFTR au niveau des canaux biliaires entraîne une réduction de la fluidité de la bile et de son alcalinité. L'épaississement de la bile provoque une augmentation de la concentration des acides biliaires ce qui contribue à une sécrétion anormale. Puisque la bile est nécessaire pour la digestion des lipides, ceux-ci ne sont pas digérés adéquatement, ce qui contribue également à la stéatorrhée [72].

1.4.3.3 Complications secondaires

Dans les dernières décennies, les enfants FK ne vivaient pas jusqu'à l'âge adulte. Or, ces patients ont maintenant une espérance de vie de plus en plus prolongée dépassant la cinquantaine. Par contre, avec ce vieillissement surviennent de nouvelles complications qui se superposent aux atteintes pulmonaires et gastro-intestinales préexistantes (Figure 11). Les complications secondaires les plus prévalentes sont le diabète lié à la FK (DLFK) et la maladie osseuse associée à la FK (*CFBD; cystic fibrosis bone disease*) [72].

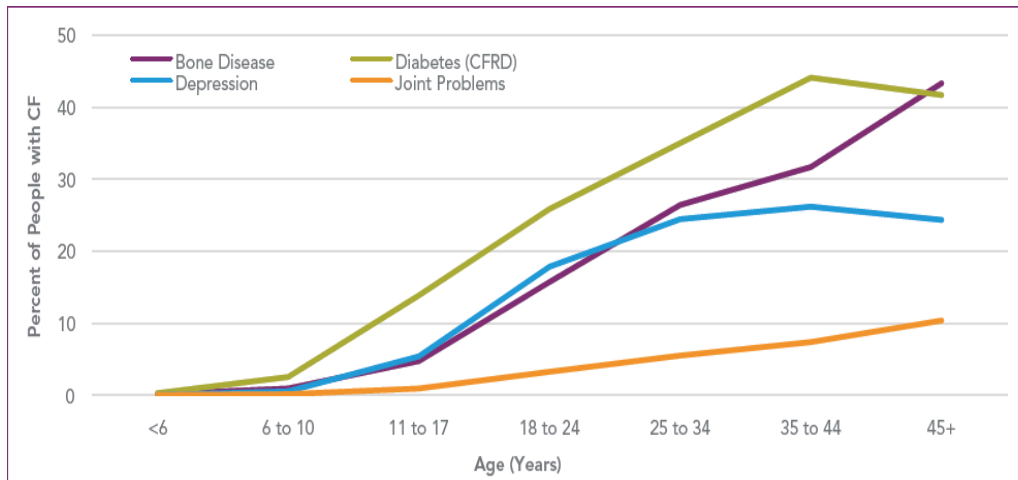


Figure 11: Complications les plus communes en fonction de l'âge [61]

Le diabète chez les personnes non-FK se divise en deux types soit le diabète insulino-dépendant (type I) et le diabète non insulino-dépendant (type II). Le DLFK, lui, est considéré comme une condition clinique unique, car il manifeste certains aspects communs aux deux types de diabète telles la production insuffisante d'insuline et l'insulinorésistance. L'obstruction des canaux pancréatiques par l'accumulation de mucus mène à une destruction globale de l'architecture du pancréas affectant également le pancréas endocrin. Ceci résulte en une diminution du nombre de cellules alpha et bêta et conséquemment à une déficience en insuline [73]. De plus, ces patients répondent de façon variable à l'insuline et cette résistance corrèle avec la sévérité de la maladie pulmonaire et le niveau d'inflammation systémique [74]. Marshall *et al.* rapportent que le métabolisme du glucose est grandement influencé par des facteurs uniques à la FK comme la malnutrition, l'inflammation chronique et aiguë, une dépense énergétique plus grande, une déficience en glucagon, la malabsorption intestinale, un transit intestinal plus lent, l'insuffisance rénale et une fonction respiratoire plus basse [72]. Des études épidémiologiques ont démontré une corrélation entre le DLFK et l'insuffisance pancréatique, le sexe féminin et l'augmentation de l'âge [73].

Une autre complication chez les patients atteints de mucoviscidose est la maladie osseuse. Cette condition se caractérise par une densité osseuse amoindrie résultant en une fragilité osseuse et un risque élevé de fractures, surtout costales et vertébrales [75]. Bien que la

maladie osseuse est bien documentée chez ces patients, les causes exactes ne sont pas encore élucidées. À l'heure actuelle, cette pathologie est connue comme étant multifactorielle pouvant être attribuée à plusieurs causes telles que l'absence du CFTR, la malnutrition, l'insuffisance en vitamine D, l'hypogonadisme et l'inflammation. Par contre, l'impact de chacun de ces facteurs sur le développement et la progression de la maladie n'est pas encore établi.

1.4.4 Maladie osseuse associée à la fibrose kystique

1.4.4.1 Manifestations

Cette maladie est caractérisée par une densité osseuse amoindrie (ostéopénie ou ostéoporose), une fragilité osseuse ainsi qu'un risque élevé de fractures surtout au niveau costal et vertébral [76]. Ces atteintes aggravent la condition clinique préexistante des patients FK. En outre, la présence de fractures a un grand impact sur la qualité de vie de ces patients, car elles peuvent causer des douleurs, une cyphose et des difformités de la cage thoracique. Ces atteintes compromettent la capacité à tousser et à expectorer et limitent grandement l'efficacité de la physiothérapie respiratoire basée sur la percussion de la cage thoracique (*clapping*). De ce fait, la clairance pulmonaire est compromise, ce qui peut engendrer une exacerbation des symptômes pulmonaires [76]. De plus, l'ostéoporose sévère est une contre-indication à la transplantation pulmonaire [76]. On rapporte que la prévalence de l'ostéopénie et de l'ostéoporose est de 38% et 23.5% respectivement [76]. De plus, ces patients présentent le même taux de fractures qu'une femme ménopausée, mais ces fractures surviennent de façon prématurée soit jusqu'à trois décennies plus tôt qu'attendu [77]. Ces manifestations peuvent apparaître chez l'enfant FK, mais s'aggravent en vieillissant [76]. Il est rapporté que les enfants n'atteignent pas leur pic de masse osseuse, ce qui contribue à une masse osseuse amoindrie à l'âge adulte [77]. Effectivement, les jeunes adultes FK sont reconnus comme étant moins grands et moins corpulents que la population générale [77]. Aris *et al.* ont rapporté que cette différence de taille se manifeste non seulement par une quantité osseuse moindre, mais également par une microarchitecture disproportionnée caractérisée par une BMD amoindrie autant au niveau trabéculaire que cortical par rapport à leur IMC et ce, surtout au niveau du tibia [77]. Des analyses histomorphométriques de l'os chez des patients FK cliniquement

stables ont également permis de confirmer ces résultats. Celles-ci rapportent un volume osseux trabéculaire amoindrie ainsi qu'une augmentation de la porosité au niveau du réseau trabéculaire [78]. De plus, chez ces mêmes individus, la largeur de l'os cortical et le nombre de *basic multicellular units* (BMU), les cellules responsables du remodelage osseux soit les Ob et les Oc, étaient amoindris de 50% et le taux d'apposition de l'ostéoïde était 10% plus basse que la normale [77]. D'autre part, les cavités de résorption avaient une surface d'érosion significativement plus élevée parallèlement à une zone de reconstruction amoindrie comparativement aux contrôles. Tous ces résultats suggèrent un découplage du remodelage osseux caractérisé par une diminution de la formation osseuse au niveau tissulaire et cellulaire et une augmentation de la résorption osseuse [77].

Au niveau clinique, de nouveaux marqueurs biochimiques spécifiques permettent d'étudier l'activité globale de la formation et de la résorption osseuse, et ce, de façon non invasive. Parmi ceux-ci, on retrouve l'OCN, le *carboxy-terminal propeptide of type I procollagen* (PICP) et l'activité de la ALP spécifique à l'os qui sont des marqueurs de la formation osseuse et l'OPG, le RANKL, le TRAP, le *cross-linked carboxy-terminal telopeptide of type I collagen* (ICTP) qui sont des marqueurs de résorption osseuse. Les études s'accordent à dire que l'on observe chez les patients FK, une augmentation des marqueurs de résorption osseuse tant au niveau sanguin qu'urinaire et ce, parallèlement à une diminution des marqueurs de formation osseuse [79-82]. Ces résultats suggèrent qu'il y a un déséquilibre des marqueurs de remodelage osseux avec une résorption osseuse excédant la formation osseuse, et ce même chez les patients FK stables [82].

1.4.4.2 Pathogenèse et pathophysiologie

Encore à ce jour, la pathogenèse de cette maladie osseuse est considérée comme étant multifactorielle pouvant être causée par une insuffisance en vitamines K et D, une malabsorption de calcium, une malnutrition, la prise de glucocorticoïdes, une puberté retardée, l'hypogonadisme et une inflammation systémique [79-82]. L'effet de chacun de ces facteurs résulterait à un découplage du remodelage osseux soit une formation osseuse amoindrie combinée à une augmentation de la résorption osseuse [83]. En effet, une insuffisance en vitamine D et une malabsorption de calcium stimulent la sécrétion de PTH, ce qui accroît

l'ostéoclastogénèse et donc la résorption osseuse [83]. De plus, la prise de corticostéroïdes réduit l'absorption de calcium intestinal et augmente la production du RANKL stimulant l'activité ostéoclastique. Plusieurs études ont également démontré une corrélation entre la masse osseuse, la sévérité de la maladie pulmonaire et l'inflammation chronique [84-86]. Les facteurs pro-inflammatoires tels que NF- κ B, IL-6 et la protéine réactive C exercent une régulation positive sur l'ostéoclastogénèse [84-86]. Bien que l'implication des facteurs mentionnés précédemment aggrave les atteintes osseuses, une étude portant sur la maladie osseuse chez les enfants FK démontre que dès l'âge de 6 ans ces enfants ont une densité osseuse amoindrie même s'ils ne présentent pas d'atteinte pulmonaire grave (VEMS moyen de $82\pm 4\%$) et ont un statut nutritionnel normal (96% du poids idéal selon l'âge) [84-86]. De plus, il a déjà été démontré que même si les niveaux circulants de 25-hydroxyvitamine D étaient plus bas chez les patients FK comparés à ceux d'une population normale, il n'y avait aucune association entre la BMD et le statut de vitamine D chez ces patients. D'ailleurs, une supplémentation de vitamine D n'a permis aucun bienfait sur la BMD, le risque de fractures et les marqueurs de résorption osseux chez des individus FK [84-86].

La dysfonction du CFTR pourrait également être un facteur impliqué dans la pathogenèse de la maladie osseuse de la FK [84-86]. Cette hypothèse n'est pas aisément vérifiable chez l'homme puisqu'il n'est pas possible d'étudier l'impact seul de l'absence du CFTR sur le métabolisme osseux. Par contre, plusieurs études traitent de l'implication du CFTR dans la maladie osseuse au sein de plusieurs modèles murins FK. Ceux-ci permettent d'isoler l'effet du CFTR sur l'os sans l'influence des autres complications ou facteurs associés à la maladie tels la malnutrition, l'inflammation, l'usage de corticostéroïdes et la maladie pulmonaire. À ce jour, les études *in vivo* sur les souris FK rapportent toutes un phénotype osseux caractérisé par une ostéopénie autant au niveau de l'os trabéculaire que de l'os cortical et ce, peu importe le fond génétique du modèle murin (i.e. C57Bl6 ou BALB/c) ou le type de modèle [76, 87-89]. Ainsi, les souris *Cftr*^{-/-} et $\Delta F508$ ont un phénotype osseux similaire. Toutefois, ces deux modèles présentent aussi une obstruction intestinale, nécessitant une diète spéciale, qui peut aussi être à l'origine de la maladie osseuse. Néanmoins, la souris *Cftr*^{-/-} surexprimant le CFTR dans l'intestin (*gut-corrected CF mice*) qui ne présente pas d'obstruction intestinale, de malabsorption ou de déficiences nutritionnelles, démontre également un phénotype osseux, ce

qui soutient l'hypothèse que l'absence du CFTR a un impact sur l'os (76). Cette hypothèse est soutenue par l'étude de Haston *et al.* rapportent un phénotype osseux anormal malgré des taux PTH et de vitamine D circulant normaux dans leur modèle murin [76, 87-89]. Ces résultats permettent ainsi d'éliminer certains facteurs hormonaux pouvant influencer négativement le système osseux. Toutefois, le seul facteur pouvant avoir un certain impact sur l'os est l'*insulin-like growth factor 1* (IGF-1) qui est indispensable pour la croissance osseuse. En fait, certaines études ont rapporté une baisse de la concentration de cette hormone autant chez l'humain que chez la souris, qui pourrait expliquer le retard de développement et contribuer au développement de la maladie osseuse [87, 90]. Encore à ce jour, bien que nous sachions que les femmes sont plus sévèrement affectées que les hommes, il n'existe pas d'évidence indiquant que les hormones sexuelles soient reliées à la pathologie osseuse. Or, il a déjà été démontré que le retard de croissance des adolescents FK est relié à une déficience à l'IGF-1 et non pas aux hormones sexuelles [87, 90].

Le phénotype osseux des modèles de souris FK se caractérise par un volume osseux, une densité osseuse et un nombre de travées amoindries ainsi qu'un amincissement significatif de l'os cortical. De plus, la plupart des études s'entendent à dire que cette pathologie est causée par une résorption osseuse accélérée, et ce, en absence d'une compensation au niveau de la formation osseuse par les Ob. Ceci corrobore les résultats démontrant, par l'intermédiaire d'un marquage par la calcéïne des fronts de minéralisation, que les souris FK ont une formation osseuse moins importante que les souris *wild type* (WT) [84-86]. Bien que, la plupart des études portant sur l'os en FK sont réalisées chez la souris, le même genre de phénotype est observé dans un autre modèle animal soit le cochon FK [84-86]. Une investigation du système osseux dans le contexte du modèle FK du furet reste encore à être réalisée [84-86].

Outre ces observations fort descriptives, les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine du phénotype osseux demeurent encore très vagues et il existe une certaine disparité au niveau des résultats. Une étude de Shead *et al.* [91] a démontré que le CFTR chez l'humain est exprimé autant par les Ob que par les Oc. De plus, chez l'humain atteint de la FK, on rapporte un nombre moindre d'Ob qui se traduit par une production d'ostéoïde réduite ainsi qu'une augmentation du nombre d'Oc et donc une plus grande résorption [84-86]. Par contre, le portrait serait différent chez la souris. En effet, une étude par Stalvey *et al.* a démontré que

chez la souris, les Oc dérivés de la moelle osseuse n'expriment pas le CFTR [84-86]. L'auteur explique ce résultat divergent en justifiant que l'anticorps utilisé dans l'étude de Shead *et al.* pourrait être moins spécifique ou que le niveau d'expression du CFTR dans l'Oc pourrait ne pas être détectable chez la souris. Par contre, ceci n'est pas le cas pour les Ob dérivés du calvaria, car ceux-ci expriment le CFTR autant au niveau protéique qu'au niveau de l'ARN messenger. D'autre part, les connaissances de la pathophysiologie de la maladie osseuse chez les souris se résument par une similitude dans le nombre d'Oc et d'Ob entre les souris FK et WT. La différence se situerait plutôt au niveau de l'activité de ces cellules [88, 92]. Selon Stalvey *et al.*, les Ob sembleraient avoir un défaut de différenciation et une expression amoindrie de l'OPG [84-86]. De façon intéressante, ils n'ont pas noté de différence au niveau de l'expression du RANKL entre les *Cftr* *+/+* et *Cftr* *-/-*. Une diminution d'OPG couplée à des niveaux inchangés de RANKL entraîne une augmentation du ratio RANKL/OPG, ce qui favorise l'ostéoclastogenèse et la différenciation ostéoclastique. Ces résultats suggèrent que l'effet ostéoclastique serait en fait médié par les Ob et ne proviendrait pas d'un défaut intrinsèque à l'Oc.

1.4.4.3 Recommandations et traitements

Toutes ces études jouent un grand rôle dans la progression des connaissances sur cette pathologie dont le dépistage demeure encore largement sous-évalué. En effet, une des seules recommandations émises par la Fondation de FK (*CF Foundation*) est que tout patient atteint de FK doit avoir passé une densitométrie osseuse (DEXA) à l'âge de 18 ans [80, 83, 93, 94]. Les résultats d'un DEXA scan sont exprimés sous la forme de 2 scores soit le score T et le score Z exprimés en écart-type (*standard deviation; SD*) [95]. Le score T compare la densité osseuse chez le patient avec la densité osseuse maximale d'une population de référence. Tandis que le score Z compare la densité minérale osseuse du patient à celle d'un groupe de personnes ayant le même âge, taille et sexe. Un score T ou Z entre -1.0 et -2.5 SD indique une ostéopénie et un score inférieur à -2.5 SD indique une ostéoporose [95]. Chez les patients FK, si le score T ou Z se trouve entre -1 et -2 SD, un test de densitométrie osseuse devrait être fait

à tous les deux à quatre ans. Toutefois, si le résultat est égal ou inférieur à -2SD, l'analyse doit être répétée annuellement.

L'optimisation de la santé osseuse par la prévention et les traitements chez les patients FK est diversifiée. Elle inclut des interventions nutritionnelles, une supplémentation en vitamine K, vitamine D et en calcium et la pratique d'exercice de port de poids ou comportant un impact (tel que la marche, le jogging ou l'entraînement aux poids) [96]. De plus, des évaluations hormonales sont faites afin de s'assurer que les niveaux d'hormones de croissance et sexuelles soient normaux. En termes de traitement, la prise de bisphosphonates par voie orale et intraveineuse est de plus en plus utilisée, puisque des études ont démontré que cette supplémentation augmentait la densité osseuse entre 4-6% surtout au niveau des lombaires [96]. Toutefois, une évaluation plus détaillée doit être faite au sujet des bisphosphonates, car la prise de ceux-ci a plusieurs effets secondaires (i.e douleurs au niveau des os et douleur gastro-intestinale) [49]. De plus, ces médicaments inhibent non seulement la résorption osseuse, mais également la formation osseuse. Or, dans un contexte de FK où la formation osseuse est diminuée, les bisphosphonates ne représentent peut-être pas la meilleure option thérapeutique. La seule autre alternative à ce traitement est la prise de tériparatide. La tériparatide est une parathormone recombinante (rhPTH) dérivée de la PTH. Contrairement aux bisphosphonates, la tériparatide est un agent ostéoformateur. En effet, elle exerce un effet anabolique en augmentant le remodelage osseux en favorisant la formation osseuse par les Ob plutôt que par l'inhibition des Oc. Ce traitement est déjà utilisé chez les femmes post ménopausées ostéoporotiques, mais son effet chez les patients FK souffrant de maladie osseuse n'est pas encore bien documenté. Une seule étude a étudié son effet chez quatre patients FK et a rapporté que trois de ces quatre patients avaient connu une amélioration de leur BMD après 2 ans de thérapie [97]. Leurs résultats sont prometteurs, mais plus d'études devront être faites à ce sujet afin de déterminer si ce traitement est le meilleur choix.

Chapitre 2. Problématique, Hypothèses et Objectifs

2.1 Problématique

Il est documenté que plus de la moitié des patients FK souffrent d'une atteinte osseuse caractérisée par une densité osseuse amoindrie, une fragilité osseuse ainsi qu'un nombre élevé de fractures [77]. Bien que cette pathologie soit prévalente, elle est encore grandement sous-évaluée et les moyens visant à la prévenir et la contrôler ne sont pas clairement définis. Or, l'impact de la CFBD sur la qualité de vie des patients FK est considérable puisqu'elle compromet leur capacité à tousser, à subir leur traitement quotidien de physiothérapie respiratoire et même à être considéré pour une greffe pulmonaire.

Encore à ce jour, cette maladie est considérée comme étant multifactorielle pouvant être attribuée à des facteurs d'ordre génétique (i.e. absence ou mutations du CFTR), nutritionnel (i.e. malabsorption et malnutrition incluant des déficiences en vitamine D ou en calcium), hormonal (i.e. hypogonadisme, puberté retardée, diabète, niveaux abaissés d'IGF-1), médicamenteux (i.e. corticostéroïdes) et inflammatoire. Or, l'impact de chacun de ces facteurs sur la progression de cette pathologie n'est toujours pas établi. Plusieurs études laissent croire que la maladie osseuse s'instaure bien avant la progression de la FK. En effet, une diminution de la densité osseuse a déjà été rapportée avant l'âge de 6 ans chez des enfants FK ayant un bon statut nutritionnel et une atteinte pulmonaire légère [49].

Les études utilisant des modèles animaux FK démontrent que les souris *Cftr*^{-/-} ont un phénotype osseux ostéoporotique malgré l'absence de plusieurs facteurs étiologiques présents chez l'humain (i.e. déficience en vitamine D, diabète, usage de corticostéroïdes, inflammation), ce qui restreint considérablement le champ de facteurs pathogéniques pouvant expliquer le phénotype osseux murin. Ces constats nous amènent donc à postuler que l'absence du CFTR a un impact direct sur le métabolisme osseux. Or malgré ces évidences, peu d'études ont caractérisé le rôle de ce canal ionique au niveau des cellules osseuses et du métabolisme osseux. Cette étude entend élargir les connaissances à ce sujet.

De plus, une panoplie d'études démontre l'importance de la niche ostéoblastique dans le maintien des HSC. Le lien entre l'os et l'hématopoïèse est connu depuis les années 1970 et on

sait que la localisation des HSC dans la moelle osseuse n'est pas aléatoire puisque ceux-ci sont présents en abondance à proximité de l'endoste riche en Ob[98]. En effet, les données précédentes montrent qu'en modulant la quantité d'Ob dans des modèles murins, il est possible de moduler le nombre de HSC [99]. De plus, une augmentation du volume trabéculaire corrèle avec une augmentation du nombre de HSC [49]. Ce genre de lien n'a jamais été étudié dans un contexte pathologique, tel que la FK, où le volume osseux est amoindri.

2.2 Hypothèses et Objectifs

Dans ce contexte, les hypothèses sous-tendant ce projet sont les suivantes:

- (1) Le phénotype osseux observé chez les souris *Cftr*^{-/-} est causé par l'absence du CFTR et non par d'autres facteurs pathogéniques.
- (2) La déplétion génique du CFTR dans un modèle murin a un impact négatif sur la différenciation ostéoclastique en l'augmentant.
- (3) La déplétion génique du CFTR dans un modèle murin exerce un impact négatif sur le métabolisme osseux en altérant le processus de différenciation ostéoblastique et les fonctions (i.e. minéralisation) de ces cellules.
- (4) L'absence du CFTR a un impact négatif sur la niche hématopoïétique de la MO qui se traduit par une altération des niveaux intramédullaires des différentes populations de leucocytes.

Afin de vérifier ces hypothèses, des objectifs spécifiques ont été posés et vérifiés par une approche expérimentale combinant des études *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro* chez un modèle de souris *Cftr*^{-/-} :

- (1) Confirmer que le phénotype osseux des souris *Cftr*^{-/-} est causé par l'absence du CFTR et non par d'autres facteurs pathogéniques tels l'hypogonadisme, la malnutrition ou la malabsorption.
- (2) Déterminer la présence du CFTR au niveau des Ob et des Oc et étudier l'impact de l'absence de cette protéine sur leur différenciation et fonction.

(3) Examiner l'impact de l'absence du CFTR sur la niche leucopoïétique, et tout particulièrement sur le nombre de cellules leucopoïétiques.

Chapitre 3. Matériels et méthodes

3.1 Modèle animal

Toutes manipulations et procédures effectuées sur des souris ont reçu l'approbation du Comité institutionnel de bonnes pratiques animales en recherche (CIPBAR) du CHU Sainte-Justine avec les recommandations du Conseil canadien de protection des animaux (CCPA).

Le modèle murin utilisé pour ce projet a été obtenu par croisement de souris congéniques *Cftr*^{UNC+/-} BALB/c provenant du Dr. C Haston des laboratoires Meakins-Christie de l'Université McGill. Il s'agit de souris dont le gène CFTR contient une mutation insertionnelle au niveau de l'exon 10 créant ainsi un *knockout* complet. La colonie était hébergée à l'animalerie du CHU Sainte-Justine. Afin d'éviter l'obstruction intestinale prévalente chez les souris homozygotes (*Cftr* -/-), les souriceaux reçoivent le PegLyte™ (ou Colyte™) comme eau de boisson en présence de nourriture standard et d'un mélange, sous forme de pâte, de nourriture de base mouillée avec de l'eau osmosée et ce, dès la 2^e semaine de vie. Toutes les expériences ont été faites sur des souris mâles et femelles âgées entre 10 et 12 semaines. Le groupe contrôle était constitué des souris *Cftr*+/+ de même portée.

Évaluation de la consommation journalière de nourriture

Pour s'assurer qu'il n'y avait pas de différence dans la consommation journalière de nourriture des souris selon les génotypes; différence qui pourrait avoir un impact sur la santé osseuse des modèles, la consommation alimentaire d'un sous-groupe de souris a été mesurée quotidiennement. Pour cela, les souris ont été isolées (1 souris/cage) pour une durée de 4 jours consécutifs en présence d'une diète préalablement pesée. En premier lieu, puisque les souris *Cftr*-/- sont rarement seules dans leur cage, nous les avons isolées un minimum de 24h avant cette évaluation afin qu'elles puissent s'habituer à l'isolement. Par souci de comparaison, nous avons procédé de la même manière pour les souris *Cftr*+/+ et *Cftr* -/-. La diète a été pesée à l'introduction et 24h plus tard. Cette pesée se produisait à la même heure pendant 4 jours consécutifs. En récoltant et en pesant les grains de nourriture laissés par la souris, ceci nous a permis d'avoir une évaluation précise de leur consommation quotidienne. À noter que le fond

de la cage ne contenait pas de litière afin de maximiser la récupération de la nourriture non-consommée. Le poids des souris a également été mesuré tous les jours.

Extraction de lipides dans les selles

Afin de nous assurer qu'il n'y avait pas de différences dans l'absorption des lipides, qui pourrait avoir un impact sur le métabolisme osseux, nous avons étudié la présence d'une stéatorrhée par l'extraction de lipides dans les selles. Les selles ont été récoltées au moment de la pesée de la nourriture chaque jour pendant 4 jours. L'extraction s'est fait grâce à la méthode de Folch (www.bio-protocol.org/e1375). Brièvement, 1000mg de fèces (un pool des 3 jours de collecte) étaient placés dans un tube de 15mL avec 5mL de *phosphate buffered saline* (PBS). Le tout était vortexé afin de bien mélanger les fèces pour ensuite être passé à l'homogénéisateur Polytron Pro200 (Pro Scientific Inc. Oxford CT). À cette étape, 5mL de chloroforme:méthanol (2:1) ont été rajoutés et le mélange a été centrifugé à 2000rpm pour 10 minutes à température pièce. Suite à la centrifugation, 3 phases sont formées. Celle au bas du tube, d'une couleur jaunâtre est prélevée à l'aide d'une aiguille 22G^{1/2} dans un tube de verre 16 x 100 prépesé. Il s'agit de la phase contenant les lipides. Le tube est ensuite placé sous un évaporateur sous flux d'azote pour environ 40 minutes afin d'évaporer le chloroforme :methanol résiduel. À la fin de l'évaporation, il ne restait que les lipides au fond du tube. Ce dernier a alors été pesé afin d'identifier le poids des lipides extraits selon la formule suivante :

$$\begin{aligned} & \text{Poids du tube après extraction} - \text{Poids du tube avant extraction} \\ & = \text{Poids des lipides totaux extraits} \end{aligned}$$

Immuno-enzymatique ÉLISA

La méthode ÉLISA compétition a été utilisée afin de déterminer la concentration de 17 β -Estradiol dans le sérum de souris femelles, grâce à un kit fourni par Enzo Life Sciences (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, 17 β -Estradiol high sensitivity ELISA kit). Une plaque de 96 puits est déjà prérevêtue d'un anticorps de référence *donkey anti-sheep polyclonal IgG*. Une compétition de deux étapes a été faite en incubant la plaque pendant 2h à température pièce en déposant simultanément l'échantillon dilué 1/2 et une solution jaune de l'anticorps référence

17 β -Estradiol. 50ul d'une solution bleue de 17 β -Estradiol conjugué à la ALP a également été ajouté aux puits à ce moment. Par la suite, la plaque a été rincée 4 fois avec une solution de lavage et une solution de révélation de p-nitrophényl phosphate a été ajoutée aux puits. La plaque a ensuite été incubée pendant 2h. La fraction « antigène de l'échantillon - anticorps » est éliminée par rinçage, ne laissant dans les puits que les anticorps liés à l'antigène de référence coaté. La coloration observée est donc inversement proportionnelle à la quantité d'antigène présent dans l'échantillon.

3.2 Phénotypage osseux

3.2.1 Données anthropométriques

Afin d'évaluer la différence de poids entre les souris *Cftr* +/+ et *Cftr* -/-, les souris étaient pesées au moment du sacrifice à l'aide d'une balance analytique à une précision de 0.01g. De plus, la longueur des fémurs droits était mesurée *ex vivo* à l'aide d'un pied à coulisse numérique à une précision de 0.01mm (Stoelting, Illinois).

3.2.2 Densitométrie osseuse par DEXA scan

La BMD, le contenu minéral osseux (BMC), la quantité de masse maigre et le pourcentage de gras ont été mesurés au niveau du fémur droit, des lombaires L2 à L5 et du corps au complet sur des souris *Cftr* +/+ et *Cftr* -/- *postmortem* en utilisant le Lunar PIXImus densitomètre (GE Lunar Co., Wisconsin). Les souris étaient sacrifiées quelques minutes avant de passer au DEXA scan. Les images ont été analysées avec le programme Piximus version 2.1

3.2.3 Microtomographie à rayon X (μ -CT)

Des analyses de μ -CT permettent de caractériser la structure 3D de l'os et ainsi d'étudier la microarchitecture osseuse. Cette analyse a donc été faite sur des fémurs droits *ex vivo* de souris *Cftr* +/+ et *Cftr* -/-. Au moment du sacrifice, les fémurs étaient entreposés dans du PBS à 4°C jusqu'au moment du scan. Les analyses de μ -CT de l'os trabéculaire ont été faites sur une section de 2mm du fémur droit et de la métaphyse fémorale à 250 μ m distal de la plaque de croissance. Ces analyses ont été faites avec un Skyscan 1176 (Bruker, Belgique) réglé à 50kV, 500 μ A et à une résolution de 9 μ m. Quant aux analyses de l'os cortical, elles ont été faites sur

une section de 250 μm à 2.25mm distal de la plaque de croissance. Par la suite, les images ont été reconstruites grâce au programme Skyscan NRecon, analysées avec le programme Skyscan CTAn et les modèles 3D ont été visualisés avec le programme Skyscan CTvol.

3.3 Culture des cellules osseuses

3.3.1 Culture d'ostéoclastes dérivés de la moelle osseuse

Les cultures de cellules osseuses ont été dérivées à partir de la MO qui a été obtenue en drainant les tibias et les fémurs des souris *Cftr* $+/+$ et *Cftr* $-/-$ avec une aiguille 25G^{5/8}. La MO a été collectée dans 5mL de PBS et centrifugée à 1500 rpm pendant 5 minutes à température pièce. Afin d'obtenir seulement la lignée leucocytaire de la moelle osseuse, nous avons procédé à une séparation par Ficoll (Histopaque, Sigma-Alrich, St-Louis MO). Celle-ci permet une séparation en gradient basé sur les différences de densité entre les leucocytes et les autres cellules tels que les érythrocytes. La séparation se fait grâce à une centrifugation à 2000 rpm pendant 30 minutes à température pièce. Les globules rouges et les cellules polynucléaires sédimentent au fond du tube, tandis que les leucocytes forment une ligne blanche entre le Ficoll et le PBS. Ces cellules ont été retenues et ensemencées sur un pétri à une densité de 3×10^5 cellules par mL dans du Alpha Modification of Eagle's Minimal Essential Medium (α MEM) supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (SVF) (Multicell Wisent INC., St-Bruno, Québec) et 1% de pénicilline-streptomycine (P/S). Afin de différencier les cellules vers la lignée de monocytes/macrophage, du M-CSF a été ajouté au milieu pendant 24h à une concentration de 10ng/ml. Après 24h, les cellules non adhérentes, les OCP, ont été isolées et mises en culture dans des plaques de 12 puits à une densité de 5×10^4 cellules/ml en présence de M-CSF à 75ng/ml. Du RANKL à une concentration de 100ng/ml est ajouté à la culture après un autre 24h. Le premier changement de milieu a été effectué après 3 jours de culture avec du α MEM+ 10%SVF +1% P/S+ M-CSF 75ng/ml + RANKL 100ng/ml.

3.3.2 Coloration TRAP

Une coloration de la phosphatase acide tartrate résistante (TRAP) a été faite afin d'identifier les Oc matures qui sont révélées par la coloration brune du cytoplasme. Pour se faire, un kit de coloration de Sigma-Alrich a été utilisé. Cette analyse a été faite après 7 jours de culture des

Oc. Brièvement, les cellules étaient tout d'abord rincées avec du PBS 1X chaud à 37°C et fixées pendant 1 minute avec 1mL par puits de la solution de fixation fournie dans le kit (25mL de solution de citrate à 27mM pH 3.6, 65mL d'acétone et 8mL paraformaldéhyde 37%). Suite à cette fixation, les cellules ont été lavées 2 fois avec du PBS chaud et ensuite colorées avec 300ul de la solution TRAP (500uL de *Fast Garnet GBC* 7.0mg/ml dans 500uL de solution de *Sodium Nitrite* 0.1mol/L, 0.5mL Naphtol AS-BI Phosphatase 0.125mg/ml, 2mL de solution d'acétate 0.05M, 1mL de solution de tartrate 0.03M avec 45mL d'H₂O nano) pendant 1h à 37°C. Finalement, les cellules ont été rincées deux fois avec du PBS 1X chaud et les plaques ont été séchées avant de procéder au dénombrement des cellules à l'aide d'un microscope standard. Puisque les Oc ont plus de noyaux lorsqu'ils sont davantage différenciés, seulement les cellules rouges/brunes avec trois noyaux ou plus ont été comptées.

3.3.3 Culture d'ostéoblastes dérivés de la moelle osseuse

L'entièreté des cellules de la MO a été mise en culture dans du α MEM supplémenté avec 10% SVF et 1% P/S. Cette culture a été amplifiée pendant environ sept jours afin d'obtenir une confluence de 75%. À ce moment, les cellules ont été décollées à l'aide d'une solution de trypsine 0,25% - 0,5mM EDTA (Multicell Wisent INC.) et ont été mises en plaque avec un ajout de facteurs de différenciation ostéoblastique (β -glycérophosphate 10mM, Dexaméthasone 10nM et L-Ascorbic acid 2-phosphate 0.05mM, Sigma-Alrich). Les cellules ont été incubées à 37°C en atmosphère humide contrôlée à 5% de CO₂, et différenciées pendant 4,7,14,21, 28 et 35 jours avec un changement de milieu à tous les 3 jours. Ces cultures ont été utilisées pour l'extraction d'ARN, la coloration/solubilisation de rouge alizarine et le test enzymatique de la ALP.

3.3.3 Immunofluorescence

Les Ob ont été cultivés à une densité de 2.5×10^4 cellules/puits sur le système de lames Lab-TekII de 8 puits (Thermoscientific, Waltham, MA) et utilisés pour les expériences d'immunofluorescence tout au long de leur différenciation du jour 0 au jour 28. Les lames ont été lavées avec du PBS et fixées dans 3.7% de paraformaldéhyde froid, 10 min à température

pièce. Suite à la fixation, les cellules ont été lavées 2 fois au PBS 1X avant de rajouter la solution de perméabilisation de PBS-Triton 0.1% qui a été incubé pendant 10 minutes. Les lames ont été rincées 2 fois dans du PBS 1X puis mises dans une solution de blocage PBS contenant 1% d'albumine sérique bovine pendant 30 minutes. Suite au blocage, les cellules ont été incubées pendant une heure à température pièce avec l'anticorps primaire, soit l'anti-souris IgG2b CFTR 596 (Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics) à une concentration de 1/500. Après 3 lavages de 5 minutes dans la solution de blocage, les lames ont été incubées avec l'anticorps secondaire lapin anti-souris IgG AlexaFluor 594 1/100 (Life Technologies, Carlsbad, CA) pendant 1h à température pièce dans l'obscurité. Finalement, les cellules ont été lavées 3 fois avec la solution de blocage en incubant 5 minutes pour chaque lavage et ensuite lavées 2 fois au PBS 1X en incubant 5 minutes par lavage. Du ProLong Gold Antifade + DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) (Invitrogen, Carlsbad, CA) est une molécule fluorescente capable de se lier fortement à l'ADN et permet de visualiser le noyau des cellules. Toutes les analyses ont été faites avec un microscope confocal à disque rotatif (UltraVIEW Vox; PerkinElmer, Waltham, MA) avec un objectif de 100X. L'acquisition des images a été faite avec le programme Volocity Version 6 (PerkinElmer).

Extraction d'ARN

Afin de vérifier l'expression génique des facteurs de différenciation ostéoblastique, l'ARN total a d'abord été extrait des cultures cellulaires d'Ob différenciés de 0 à 28 jours à l'aide de Trizol™ (Invitrogen). Par la suite, cet ARN a été quantifié à l'aide du spectrophotomètre Nanovue Plus (GE) dont le blanc de lecture était fait avec de l'eau contenant du diethylpyrocarbonate (DEPC).

Transcription inverse (RT)

Afin d'obtenir de l'ADN complémentaire à notre ARN, 1 μ g d'ARN a été mélangé avec 30ng d'amorces aléatoires (Random Primers) et une solution de dNTP à 10mM. Le tout a été chauffé à 65°C pendant 5 minutes dans un Thermocycler S1000 (Biorad, Hercules, CA). Après ce temps, l'échantillon a été mis sur glace le temps de rajouter un mélange de tampon de réaction First-strand buffer 5x (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl)

avec du dithiothréitol (DTT) à 0,2M et du Recombinant RNase inhibitor (RNaseOUT™) à 40 unités/ul. Par la suite, ce mélange a été chauffé à 37°C pendant 2 minutes avant de rajouter de la transcriptase inverse M-MLV à 200 unités/ul. Les dernières étapes consistent en une incubation de 10 minutes à 25°C suivis par une incubation de 50 minutes à 37°C et une dernière incubation de 15 minutes à 70°C afin d'obtenir l'ADN complémentaire (ADNc) comme produit final. (Protocole Life technologies, M-MLV#28025-013). Tous les produits utilisés pour ce protocole proviennent de Life technologies Carlsbad, CA.

Réaction en chaîne par polymérase (PCR)

Suite à la transcription inverse, l'ADNc a été amplifié par PCR à l'aide de l'enzyme Taq polymérase 5U/ul (Bio Basic Canada Inc, Marham, ON.). 1ul d'ADNc a été mélangé avec le *Taq Buffer 10x* de Feldane (Bio Basic Canada Inc.), 10mM de dNTP, 10mM de l'amorce *Forward* et 10mM de l'amorce *Reverse*, du *Band Sharpener* (Bio Basic Canada Inc.) et de l'eau DEPC. L'amplification nécessite entre 20 et 45 cycles comprenant les étapes suivantes: une dénaturation de 30 secondes à 95°C, une hybridation de 45 secondes à une température spécifique pour chaque paire d'amorces, puis une élongation d'une minute à 72°C. Ces étapes sont répétées pendant un certain nombre de cycles et ce nombre dépend du gène d'intérêt. Finalement, la dernière étape de la PCR est une élongation finale de 10 minutes à 72°C. Les différentes paires d'amorces utilisées et les conditions précises de chacune d'elles sont détaillées dans le **Tableau 1**. Le gène contrôle utilisé est l'ARN ribosomal 18S.

Nom du gène	Nom de la protéine	Séquence de l'amorce 5' à 3' <i>Forward</i> <i>Reverse</i>	Taille du produit (pb)	Température d'hybridation (°C)	Nombre de cycles
m18S	petite sous-unité ribosomale	CCAGAGCGAAAGCATTGCCAAGA	690	61.5	26
		AATCAACGCAAGCTTATGACCCGC			
mSp7	Ostérix	GAGGGACGAATCTCAGGGTA	350	57.8	45
		CATCTCCCAGGAACATGATGAC			
mRunx2	runt-related transcription factor 2	TGGCCTTCCTCTCTCAGTAA	306	61.5	45
		CTATGGTACTTCGTCAGCATCC			

mAlp	Phosphatase alcaline	GAGGGACGAATCTCAGGGTA	205	60.7	45
		GTCATCATGTTTCCTGGGAGATG			
mCollA	Collagène de type 1 alpha 1	GTGCTACTGGAGTTCAAGGTC	408	61.5	45
		GATTCCCTGGACCTAAGGGTA			
mOCN	Ostéocaline	GACCATCTTTCTGCTCACTCTG	439	57.8	45
		GGTATCACTATTTAGGACCTGTGC			

Tableau 1: Conditions de PCR pour les ostéoblastes dérivés de la moelle osseuse

Coloration et solubilisation du rouge alizarine

Afin d'évaluer le degré de minéralisation de nos cultures d'Ob, une coloration rouge alizarine a été faite. Le colorant se fixe sur les dépôts cristallins de phosphates de calcium présents dans la matrice extracellulaire des Ob. Le milieu de culture a d'abord été aspiré et les puits ont été lavés avec de l'eau. Les cellules ont ensuite été fixées avec du paraformaldéhyde 3.7% à température ambiante pendant 15 minutes et lavées avec de l'eau. Par la suite, 1mL de rouge alizarine 2% à pH 4.3 a été ajouté et les cellules ont été incubées pendant 20 minutes à température pièce. Suite à la coloration, les cellules ont été lavées avec de l'eau 3 fois et le rouge non fixé a été aspiré. Une photo des puits a été prise une fois qu'ils étaient secs pour ensuite les quantifier. La quantification par solubilisation du colorant est inspirée de la méthode décrite par Gregory *et al.* [100]. Celle-ci consiste à solubiliser le rouge alizarine dans une solution d'acide acétique 10% pendant 30 minutes. Les puits sont ensuite grattés et le contenu est transféré dans des tubes eppendorfs vissés et chauffé à 85 °C pendant 10 minutes. Les tubes sont ensuite transférés sur glace pour 5 minutes avant d'être centrifugés 15 minutes à 2000g. Par la suite, le surnageant est récolté et on y ajoute de l'hydroxyde d'ammonium 10%. La lecture au spectrophotomètre se fait à 450nm en duplicata. On peut ainsi quantifier la coloration grâce à une courbe standard. Les standards sont faits à partir d'une solution de rouge alizarine (Sigma-Alrich) de 20mg/mL diluée dans de l'acide acétique 10% à différentes concentrations allant de 10µg/ml à 1mg/ml.

Phosphatase alcaline

Ce test sert à mesurer par spectrophotométrie l'activité enzymatique de la ALP active. Dans un premier temps, le milieu de culture a été aspiré et les cellules ont été lavées 2 fois avec une solution de chlorure de sodium (NaCl) 150mM. Pour mesurer l'activité enzymatique, une

solution de *phosphatase substrate* (Sigma-Alrich) dissoute à une concentration de 2.5mg/ml dans un tampon constitué de 0.1M glycine, 1mM MgCl₂ et 1mM ZnCl₂ a été ajoutée dans les puits à tester. La plaque a ensuite été incubée à 37°C pendant 30 minutes. La dernière étape consiste en l'ajout de NaOH 3M qui a pour but de mettre fin à la réaction avant de faire la mesure au spectrophotomètre. L'activité enzymatique de la ALP a été déterminée par spectrophotométrie à 405nm et comparée à une courbe standard. Les standards ont été faits à partir d'une solution de p-nitrophénol (Sigma-Alrich) diluée dans du NaOH 1M à différentes concentrations allant de 0µM à 200µM

Extraction de protéines totales

Sur glace, le milieu a été aspiré et les cellules ont été rincées deux fois avec du PBS à 4°C. Les protéines totales ont été extraites par une lyse cellulaire grâce au réactif M-PER (Thermo Scientific) en présence d'inhibiteurs de protéases: hydroxytoluène butylé (BHT, Sigma) 1%, fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF, Sigma-Alrich) 100mM et pepstatine à 250µg/ml. Afin d'obtenir un homogénat, les cellules ont été sonifiées et centrifugées pendant 5 minutes à 13000rpm. Le surnageant a été récupéré par la suite avant de procéder au dosage des protéines par la méthode de Bradford.

Profil des cellules inflammatoires par cytométrie en flux (FACS)

Préparation des échantillons

Les analyses de cytométrie en flux ont été faites sur des cultures d'Oc et trois organes différents soit la moelle osseuse complète, la rate ainsi que les ganglions. Pour chaque expérience, la préparation des échantillons n'était cependant pas la même (voir section ci-dessous).

a) Ostéoclastes

Dans le cas de la culture d'Oc, le FACS a été fait en deux temps soit après une journée de différenciation des cellules de la MO en présence de M-CSF à 75ng/ml et après 6 jours de différenciation en présence de M-CSF à 75ng/ml et de RANKL à 100ng/ml. Brièvement, à ces temps de culture, les cellules ont été trypsinisées avec de la trypsine 0.05% (Multicell Wisent INC.) et récoltées dans la solution de FACS soit du PBS contenant 1% d'albumine sérique

bovine (Multicell Wisent INC.). Les cellules ont ensuite été séparées dans des tubes eppendorfs à une densité de 1×10^6 cellules/ml. Les OCP étaient identifiés grâce au marquage Cd11b+/Ly6G low tandis que les Oc matures étaient marqués Cd11b+/F480-.

b) Moelle osseuse

Pour ce qui est de la moelle osseuse, elle a été drainée des fémurs et des tibias de nos souris et récoltée dans du PBS 1X froid puis centrifugée à 2500rpm pour 5 minutes à température pièce. La lignée leucocytaire a ensuite été séparée à l'aide du Ficoll. Les cellules ont été récoltées dans la solution de FACS et séparées dans des tubes eppendorfs à une densité de 1×10^6 cellules/ml.

c) Rate

Afin de récupérer les cellules de la rate, celle-ci a d'abord été injectée avec 2mL d'une solution de collagénase type 2 (Worthington, Lakewood NJ) (1mg/ml de PBS) avec une seringue ayant une aiguille 27G^{1/2} et 1mL de cette même solution a été ajouté autour de l'organe dans un pétri. L'organe a été découpé en plusieurs petits morceaux avec un scalpel et incubé à 37°C pendant 15 minutes. Afin d'arrêter la réaction, 5mL d'une solution de PBS supplémenté avec 10% de SVF a été ajouté. Le tout est ensuite aspiré et rejeté dans un filtre de nylon (Tamis cellulaire 100 μ m, BD Biosciences, Franklin lakes, NJ) placé dans un tube de 50mL où les morceaux de l'organe ont été écrasés à l'aide du piston de la seringue. Cette solution a ensuite été centrifugée pendant 5 minutes à 1500rpm. Le surnageant a été décanté, resuspendu dans 5mL d'une solution NH₄Cl (0.16M NH₄Cl et 0.17M Tris à un pH de 7.65) et incubé 5 minutes sur glace; cette incubation permet d'induire la lyse des globules rouges de la rate et, de ce fait, purifier les cellules avant de les passer au FACS. Le tout est ensuite centrifugé à 1500rpm pendant 5 minutes. Le surnageant a été décanté et le culot a été lavé 2 fois avec la solution de FACS. Les cellules ont ensuite été récoltées et séparées dans des tubes eppendorfs à une densité de 1×10^6 cellules/ml.

d) Ganglions lymphatiques

Pour les analyses portant sur les ganglions lymphatiques, une extraction des ganglions inguinaux et axillaires des souris a été faite et ceux-ci ont été récoltés dans du PBS 1X froid. Afin d'en extraire les cellules, les ganglions ont été écrasés entre deux lames de microscope jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de morceaux. Les lames ont été rincées avec du PBS dans un tube de 50mL. Par la suite, le tout a été centrifugé à 2000rpm pendant 5 minutes. Le culot a été lavé avec la solution de FACS et recentrifugé. Les cellules ont ensuite été récoltées et séparées dans des tubes eppendorfs à une densité de 1×10^6 cellules/ml.

Marquage cellulaire

Les différents anticorps utilisés et les conditions précises de chacun d'eux sont détaillés dans le **Tableau 2**. Nous avons tout d'abord incubé les cellules avec 5% de *Normal rat serum* (Jackson ImmunoResearch laboratories inc, West Grove, PA) afin d'éviter que nos anticorps se fixent sur des sites non-spécifiques. Après une incubation de 60 minutes à 4°C, nous avons ajouté les anticorps. Ce mélange a été incubé dans le noir à 4°C pour 60 minutes. Par la suite, les cellules ont été lavées 3 fois avec la solution de FACS. Avant de passer au FACS, les cellules ont été fixées avec de la paraformaldéhyde 1%. Le FacsCanto de BD Biosciences a été le cytomètre utilisé et le logiciel d'analyse est le FacsDiva (BD Biosciences). Les compensations ont été faites avec 10ul/test de billes de marquages positives et négatives OneComp eBeads (San Diego, CA). De plus, afin d'éliminer le bruit de fond d'un marquage, nous avons utilisé des isotypes contrôles. Pour ce faire, on utilise un anticorps monoclonal purifié, produit chez la même espèce, du même isotype et du même fluorochrome que l'anticorps d'intérêt. L'intensité du marquage obtenue permet de déterminer le niveau de fluorescence des cellules "négatives" pour ce marqueur. Ces contrôles ont été faits à 3 reprises sur chaque type cellulaire.

Anticorps	Marqueur cellulaire	Concentration	Isotype	Laser
CD45	Leucocytes	0.2 mg/ml	Rat IgG2b k	PerCP-Cyanine 5.5
CD19	Lymphocytes B	0.2mg/ml	Rat IgG2a, k	APC
CD3	Lymphocytes T			
CD11c	Cellules dendritiques	0.2 mg/ml	Armenian Hamster IgG	APC
CD49b	Cellules NK	0.2 mg/ml	Rat IgM, kappa	PE
F480	Macrophages	0.5mg/ml	Rat IgG2a, k	FITC
Ly6G	CD115-/Ly6G+ =Granulocytes	0.5mg/ml	Rat IgG2b k	FITC
Espèce		Concentration	Isotype	Laser
Contrôle				
Armenian Hamster	-	0.2mg/ml	IgG	APC
Armenian Hamster	-	0.5mg/ml	IgG	FITC
Rat	-	0.2mg/ml	IgG2a K	APC
Rat	-	0.5mg/ml	IgG2a K	FITC
Rat	-	0.2mg/ml	IgG2a K	PE
Rat	-	0.5mg/ml	IgG2b K	FITC
Rat	-	0.2mg/ml	IgG2b K	PE
Rat	-	0.2mg/ml	IgM	PE

Tableau 2: Conditions de marquage de FACS

Analyses statistiques

Les résultats présentés sont la moyenne des échantillons \pm l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les différences des moyennes entre les deux groupes expérimentaux soit *Cftr* +/+ et *Cftr* -/- ont été calculées à l'aide du test non paramétrique Mann-Whitney. Une valeur de $p < 0.05$ a été considérée statistiquement significative. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SPSS, Version 22.

Chapitre 4. Résultats

Tous les résultats proviennent d'analyses faites sur des souris mâles et femelles âgées de 10 à 12 semaines, où les souris *Cftr* *+/+* étaient utilisées comme contrôle. Cet âge correspond à un stade de maturité squelettique. Les résultats ont d'abord été analysés séparément en fonction du sexe, mais puisqu'il n'y avait pas de différences significatives entre les mâles et les femelles, ces résultats ont été combinés.

4.1 Caractérisation du phénotype osseux du modèle murin FK

Dans un premier temps, nous avons voulu caractériser le phénotype osseux de nos souris à l'aide de données anthropométriques, d'analyse de densitométrie osseuse et de μ -CT. La force osseuse est influencée par deux éléments principaux soit la masse osseuse, estimée par densitométrie, et la qualité osseuse qui dépend de la structure (la matrice, la minéralisation) et de la microarchitecture osseuse.

Les mesures anthropométriques fournissent des renseignements importants sur la composition corporelle. Les mesures de la **Figure 12A** et **B** confirment une diminution significative du poids et de la longueur fémorale chez les souris *Cftr* *-/-* comparativement aux souris *Cftr* *+/+*. Le poids était diminué de 18.8% alors que la longueur fémorale était réduite de 7.0% chez les souris *Cftr* *-/-*.

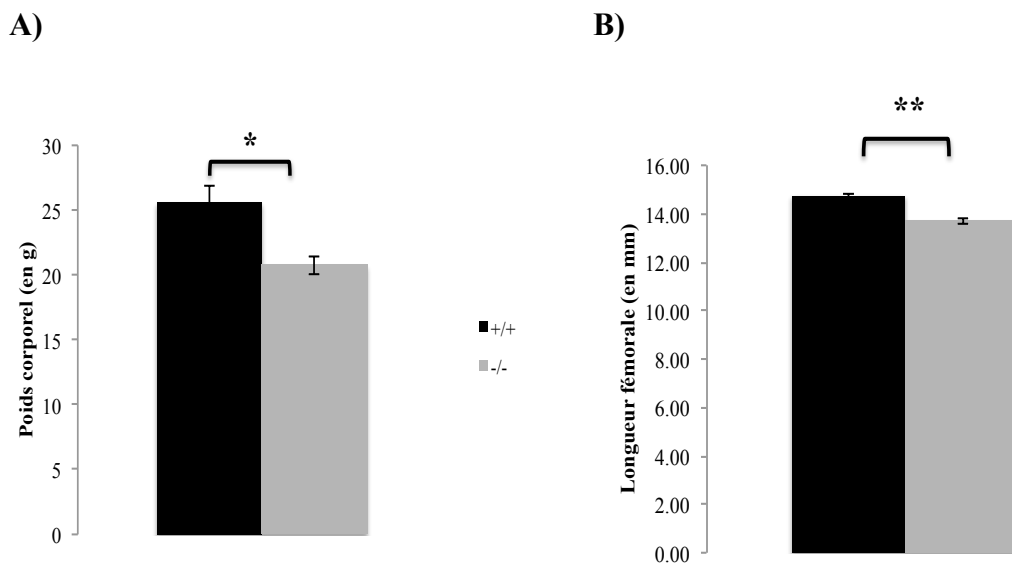
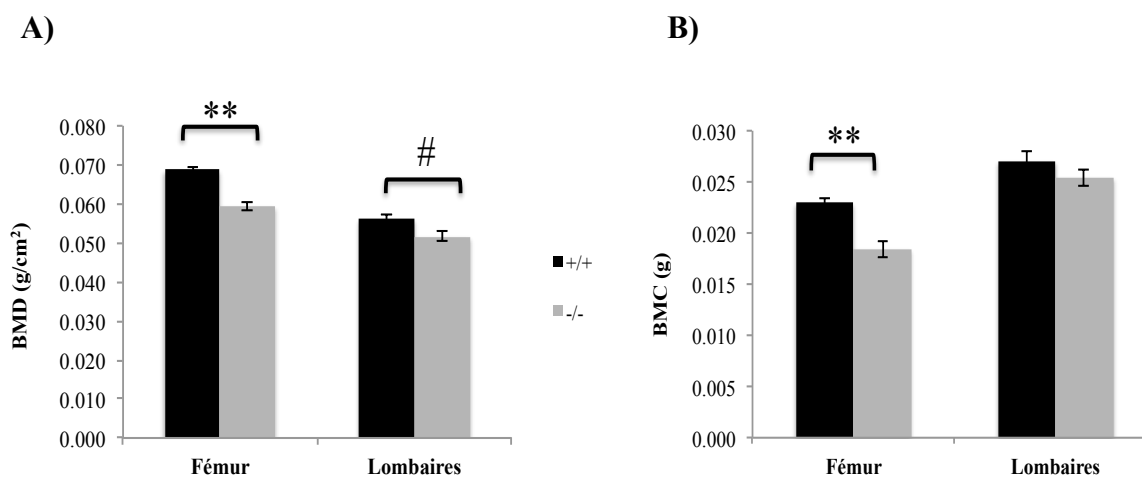


Figure 12: Caractérisation des données anthropométriques. **(A)** Le poids corporel a été mesuré à l'aide d'une balance analytique au moment du sacrifice. **(B)** La longueur des fémurs droits a été mesurée *ex vivo* à l'aide d'un pied à coulisse. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 9 à 11 souris *Cftr* *+/+* et de 7 à 8 souris *Cftr* *-/-* de 12 semaines. Le test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les moyennes. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$

D'autre part, les analyses de densitométrie osseuse ont démontré une diminution significative de 14.2% et de 8.1% de la BMD au niveau du fémur et des lombaires chez les souris *Cftr* *-/-* (**Figure 13A**) comparée aux contrôles. De plus, une réduction significative de 19.8% de la BMC a été notée au niveau du fémur des souris *Cftr* *-/-* vs. *Cftr* *+/+*. Par contre, cette diminution n'est pas observée au niveau des lombaires où il n'y a pas de différence significative entre les deux génotypes (**Figure 13B**). Au niveau du corps complet, une diminution de 15.4% et 33.3% de la masse musculaire et du pourcentage de gras respectivement, est observée chez les souris *Cftr* *-/-* par rapport aux contrôles (**Figure 13C**). Ces résultats confirment donc que la masse osseuse est affectée chez les souris FK.



C)

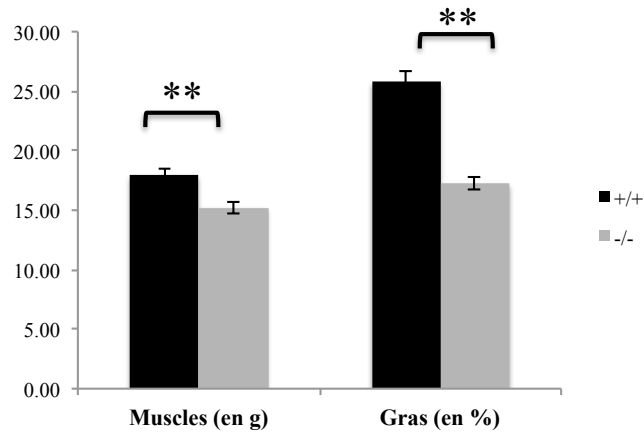
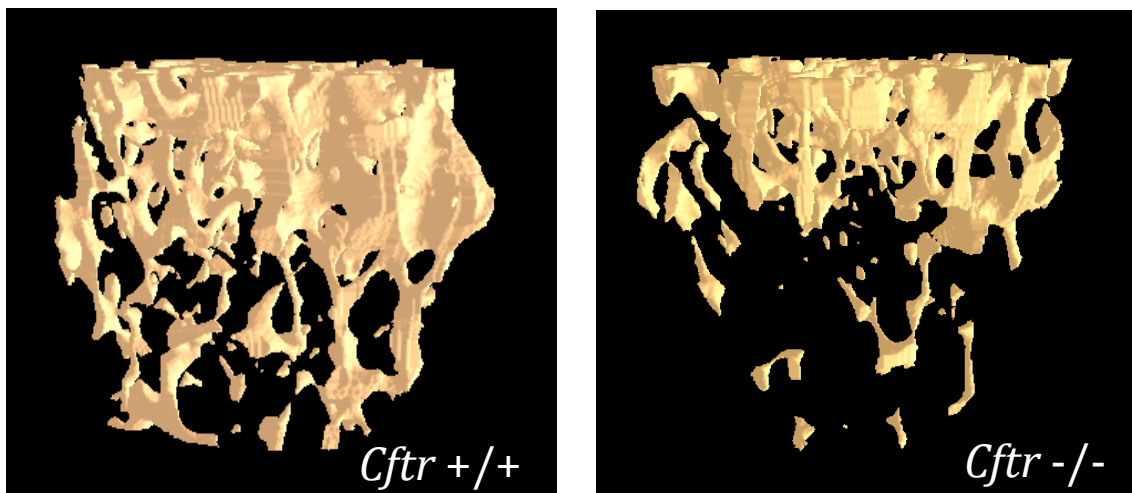


Figure 13: Caractérisation du phénotype osseux par DEXA scan. Les analyses de DEXA scan des souris *Cfr* +/+ et *Cfr* -/- postmortem âgées de 10 à 12 semaines ont été faites afin de déterminer la (A) BMD et la (B) BMC du fémur et des lombaires et (C) la masse musculaire et le pourcentage de gras du corps en entier de la souris. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 30 souris *Cfr* +/+ et de 20 souris *Cfr* -/- de 10 à 12 semaines. Le test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les moyennes. # $p < 0.05$, ** $p < 0.001$

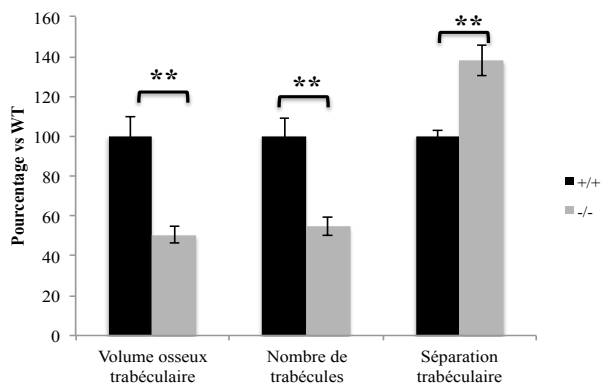
Puisque la densitométrie osseuse ne permet pas de distinguer l'os cortical de l'os trabéculaire, nous avons réalisé des analyses de μ -CT du fémur droit de nos souris (**Figure 14**). La microtomographie est une technique d'imagerie qui permet une analyse à la fois qualitative et quantitative de la microarchitecture osseuse corticale et trabéculaire de manière non destructive. Une reconstruction 3D d'une section de travées osseuses de 250 μ m à 2.25mm distal de la plaque de croissance a été faite (**Figure 14A**). En comparant à la souris contrôle, ces images permettent de voir que l'absence du CFTR chez les souris *Cfr* -/- semble affecter la structure osseuse. Cette observation est soutenue par les analyses de l'os trabéculaire en (B) qui démontrent que les souris *Cfr* -/- ont un volume osseux trabéculaire et un nombre de travées significativement réduit comparé aux souris *Cfr* +/+. De plus, les souris FK ont une séparation trabéculaire significativement plus élevée que les contrôles. Ces résultats sont signes d'une fragilité de l'os trabéculaire chez les souris *Cfr* -/-. Par contre, les analyses de l'os cortical ne suivent pas la même tendance. Aucune différence entre les génotypes au niveau du volume et de l'épaisseur de l'os cortical n'a été observée.

En résumé, ces résultats nous permettent de constater que les souris FK présentent une atteinte osseuse plus sévère au niveau du fémur que de la colonne lombaire, et que cette pathologie semble affecter l'os trabéculaire mais pas cortical.

A)



B)



C)

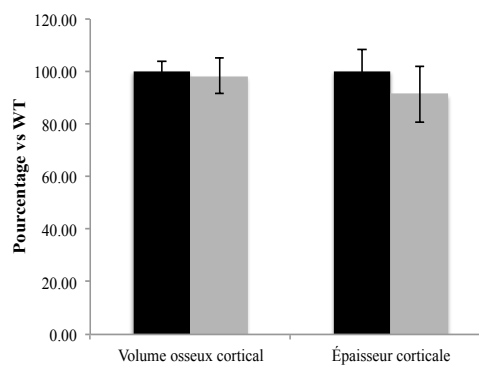


Figure 14: Caractérisation de la microarchitecture osseuse par μ -CT. Les analyses de μ -CT ont été faites au niveau du fémur droit *ex vivo* des souris *Cftr +/+* et *Cftr -/-*. Suite au sacrifice, les fémurs ont été extraits et conservés dans du PBS à 4°C jusqu'au moment du scan.

(A) Une reconstruction 3D d'une section de travées osseuses de 250 μ m à 2.25mm distal de la plaque de croissance du fémur droit. (B) Les analyses faites à partir des reconstructions de l'os trabéculaire et (C) de l'os cortical. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 10 souris *Cftr +/+* et de 8 souris *Cftr -/-* de 12 semaines. Le test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les moyennes. ** $p < 0.001$

4.2 Étude certains facteurs étiologiques de la CFBD

Puisque la CFBD est considérée comme multifactorielle, nous avons étudié la présence de facteurs tels que l'hypogonadisme (**Figure 15**), la malnutrition et la malabsorption (**Figure 16**). Ceci nous permet d'investiguer si le phénotype osseux observé chez les souris *Cftr*^{-/-} est causé par l'absence du CFTR ou encore par la présence concomitante d'autres facteurs pathogéniques. Afin de vérifier ceux-ci, nous avons tout d'abord vérifié la concentration sérique d'estrogènes par ÉLISA auprès des souris femelles *Cftr*^{+/+} comparé aux *Cftr*^{-/-}. **La Figure 15A** nous montre que les femelles *Cftr*^{-/-} ne présentent aucune différence dans leur concentration circulante d'estrogènes comparativement aux contrôles. Ces résultats suggèrent donc que les femelles *Cftr*^{-/-} ne souffrent pas d'hypogonadisme. Nous avons également mesuré la concentration circulante d'estrogènes chez les mâles (**Figure 15B**) et celle-ci, bien que beaucoup plus basse que celle des femelles, ne différait pas entre les génotypes.

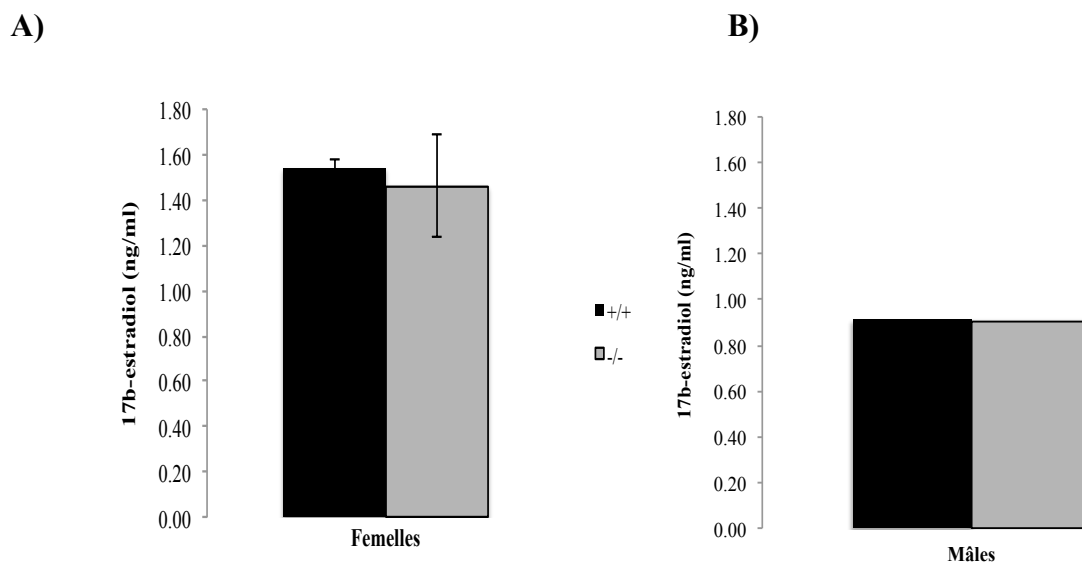


Figure 15: Concentration sérique de 17β-estradiol des souris femelles et mâles âgées de 10 à 12 semaines. Cette concentration a été mesurée par ÉLISA et les valeurs (A) représentent la moyenne \pm SEM de 18 souris femelles *Cftr*^{+/+} et de 6 souris femelles *Cftr*^{-/-} et (B) les résultats d'une souris mâle *Cftr*^{+/+} et d'une souris mâle *Cftr*^{-/-}. Différence non-significative.

La présence d'une malnutrition ou d'une malabsorption pourrait également avoir un certain impact sur le métabolisme osseux. Afin d'éliminer ces facteurs dans la pathogenèse de

la maladie osseuse de notre modèle murin, nous avons étudié la consommation quotidienne moyenne sur 4 jours ainsi que la présence de stéatorrhée chez nos souris. Les résultats de la **Figure 16A** démontrent pas de différence entre les génotypes dans la consommation quotidienne de nourriture et donc que la prise de nourriture n'est pas affectée par l'absence du *Cftr*. Toutefois, une augmentation significative de la présence de lipides dans les selles des souris *Cftr* *-/-* vs. *Cftr* *+/+* est observée.

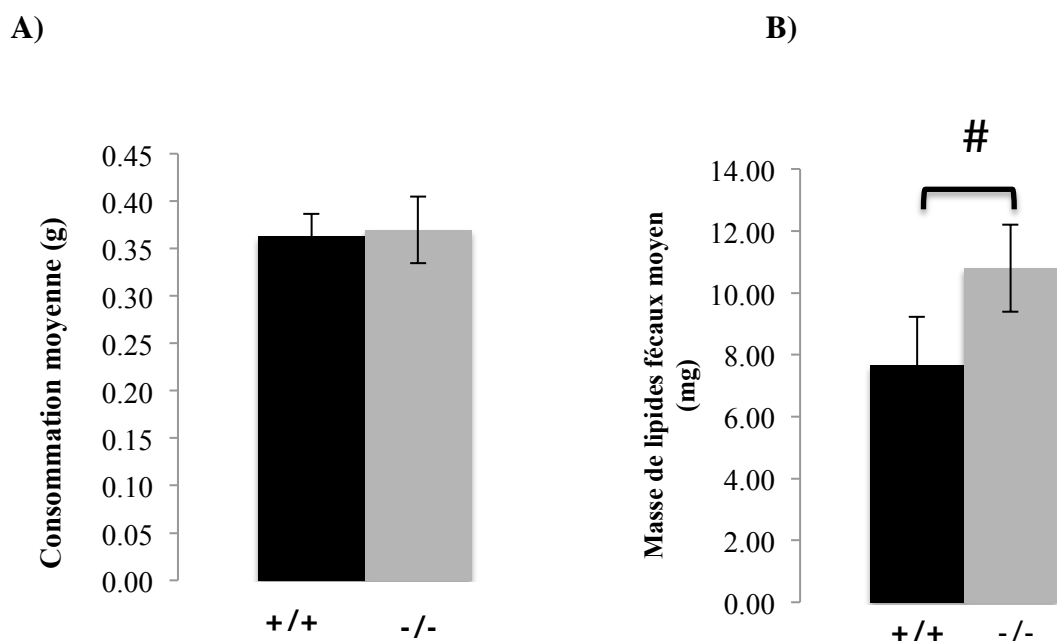


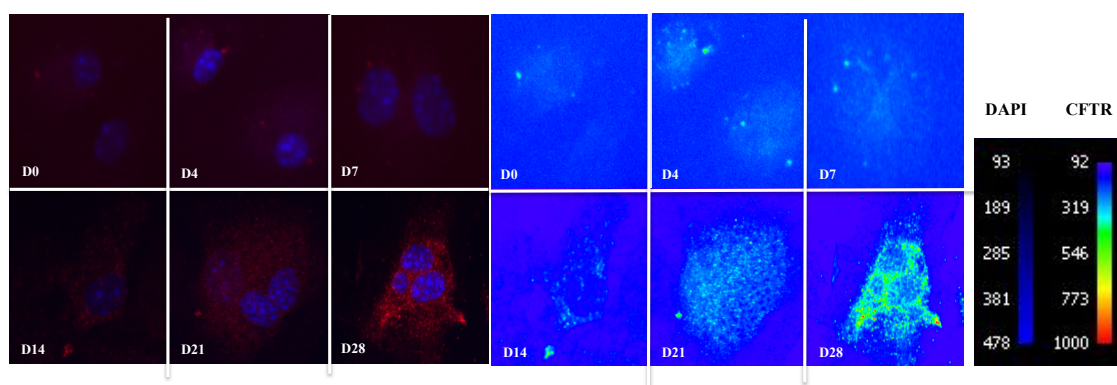
Figure 16: Analyse de la prise alimentaire et de l'excrétion fécale de lipides. Prise alimentaire quotidienne moyenne (A) et (B) poids moyen des lipides fécaux (en mg) extraits par la méthode de Folch. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 9 souris *Cftr* *+/+* et de 10 souris *Cftr* *-/-* de 12 semaines. Le test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les moyennes. # $p < 0.05$.

En résumé, ces expériences nous permettent d'éliminer l'hypogonadisme et la malnutrition comme facteurs pouvant avoir un impact négatif sur le métabolisme osseux. Toutefois, une augmentation de lipides dans les matières fécales nous laisse sous-entendre un possible problème de malabsorption qui pourrait influencer la masse osseuse ainsi que sa qualité.

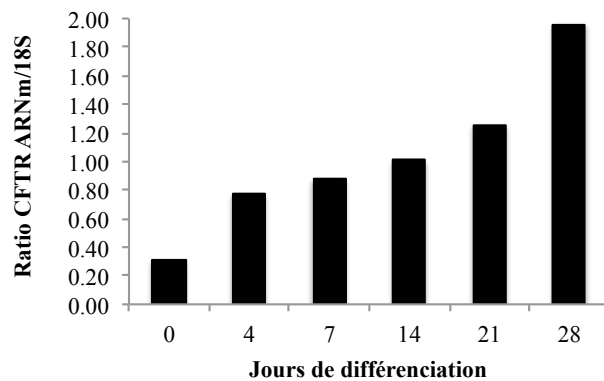
4.3 Analyses de l'expression du CFTR par les cellules osseuses dérivées de la MO

Avant d'étudier l'impact de l'absence du CFTR sur le métabolisme osseux, nous voulions tout d'abord confirmer si celui-ci était exprimé au niveau des cellules osseuses soit les Ob et les Oc dérivés de la MO. L'expression du CFTR par ces cellules n'était pas clairement établit. Chez l'humain, il a été rapporté que le CFTR est exprimé autant au niveau des Ob que des Oc [91], mais, chez la souris, on croit qu'il n'est qu'exprimé que par les Ob [83]. Il nous paraissait donc primordial de déterminer si le CFTR était présent au niveau des cellules osseuses de notre modèle murin *Cftr* +/+. À la **Figure 17A**, nous pouvons constater que non seulement le CFTR est exprimé au niveau protéique, mais que son expression semble augmenter avec le temps de différenciation ostéoblastique. De plus, nous pouvons remarquer que le CFTR est localisé au niveau du cytoplasme et non pas au niveau de la membrane, indiquant une localisation non classique dans ces cellules. Nous pouvons remarquer la même tendance au niveau de l'expression génique du CFTR à la **Figure 17B**, c'est-à-dire que son expression augmente avec le temps de maturation de l'Ob. Toutefois, les résultats de RT-PCR de la **Figure 17C** nous permettent de constater que le CFTR n'est pas exprimé par les Oc dérivés de la MO.

A)



B)



C)

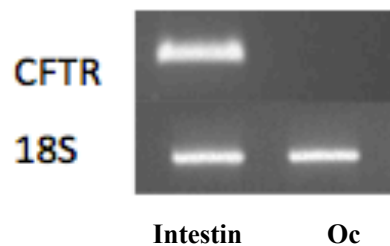


Figure 17: Expression du CFTR par les cellules osseuses. Expression (A) protéique et (B) génique du CFTR par des Ob différenciés de 0 à 28 jours à partir de cellules stromales de la moelle osseuse provenant d'une souris *Cftr* +/+. (A) L'expression protéique a été visualisée par immunofluorescence à l'aide d'un microscope confocal. Le *Cftr* est représenté par la couleur rouge alors que les noyaux sont en bleu. L'image de droite permet de visualiser le niveau d'expression à l'aide d'un contraste de couleur bleu et vert. Suite à une extraction des ARN totaux, l'expression du CFTR a été déterminée par RT-PCR au niveau des Ob dérivés de la MO (B). Ce résultat a été normalisé en fonction de l'expression de l'ARN ribosomal 18S. (C) L'expression génique du CFTR au niveau des Oc dérivé de la MO avec un échantillon de protéines d'intestin de souris comme contrôle positif. Tous ces résultats ont été obtenus à partir d'une souris mâle *Cftr* +/+ âgée de 12 semaines.

4.4 Impact de l'absence du *Cftr* sur les cellules osseuses

4.4.1 Profil de différenciation des Oc dans un modèle murin *Cftr* -/-

Ayant préalablement déterminé que les Oc dérivés de la MO n'expriment pas le CFTR, nous voulions vérifier le niveau d'atteinte de ce type cellulaire dans notre modèle murin. Pour se faire, nous avons analysé la différenciation ostéoclastique par FACS d'une culture d'Oc dérivés de la MO et différenciés 1 jour en présence de M-CSF et 6 jours en présence de M-CSF et

RANK-L (**Figure 18A**). Ces observations ont permis d'investiguer si les souris *Cftr* *-/-* avaient un nombre d'OCP ou d'Oc matures différent du contrôle. Le nombre d'Oc matures a été déterminé grâce à une autre technique soit par coloration TRAP (**Figure 18B**). Nos résultats de FACS confirment une absence de différence entre le nombre d'OCP au jour 1 et d'Oc matures au jour 6 entre les souris *Cftr* *-/-* et *Cftr* *+/+*. Ces résultats corroborent les résultats de la coloration TRAP qui ne démontrent pas de différences entre les génotypes pour ce qui est du nombre d'Oc matures. Ces résultats semblent logiques puisque les Oc n'expriment pas le *Cftr* de façon intrinsèque et donc son absence dans un modèle KO ne devrait pas avoir de conséquences sur leur développement.

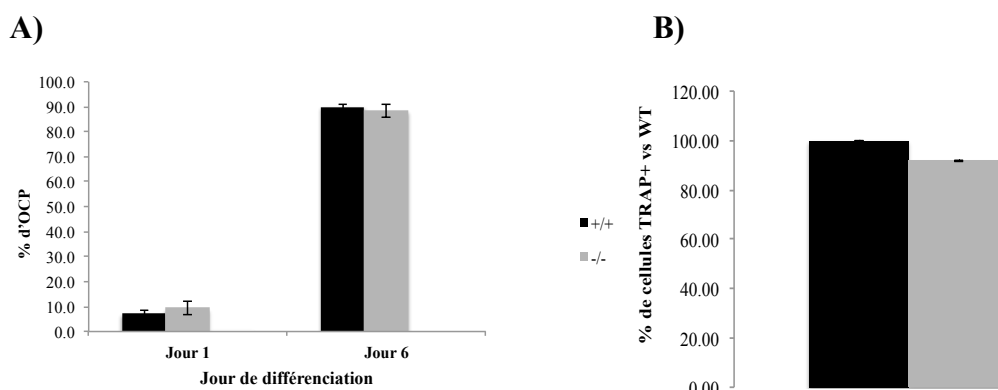


Figure 18: Effet de l'absence du *Cftr* sur la différenciation ostéoclastique dérivée de la MO. La **Figure 18A** représente le pourcentage d'OCP après une différenciation de 1 jour en présence de M-CSF à 75ng/ml et après 6 jours de différenciation en présence de M-CSF à 75ng/ml + RANKL à 100ng/ml. La **Figure 18B** représente le pourcentage d'Oc matures TRAP+ après 6 jours de différenciation en présence de M-CSF à 75ng/ml + RANKL à 100ng/ml par rapport au contrôle *Cftr* *+/+*. Le nombre de cellules TRAP+ a été compté au microscope et seules les cellules rouges/brunes avec trois noyaux ou plus ont été comptées. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 10 à 17 souris *Cftr* *+/+* et de 7 à 13 souris *Cftr* *-/-* âgées de 10 à 12 semaines. Résultats non significatifs (NS).

4.4.2 Profil de différenciation des Ob dans un modèle murin *Cftr* *-/-*

Puisque les cellules formatrices de l'os expriment le CFTR et qu'il n'y avait aucune différence n'a été observée au niveau des Oc, nous nous sommes tournés vers les Ob afin de vérifier si l'absence du CFTR avait un impact sur leur différenciation. La **Figure 19** représente les

patrons géniques d'expression par RT-PCR de multiples facteurs de différenciation tout au long de la maturation ostéoblastique du jour 0 au jour 28. La **Figure 19A et B** représente les facteurs *Runx2* et *Sp7* qui sont deux marqueurs de la phase précoce de la différenciation, tandis que les Figures **19C et D** représentent les gènes *Coll1A* (collagène de type I) et *Alp* qui sont des facteurs de la phase intermédiaire. Finalement, la **Figure 19E** représente l'*OCN*, un marqueur de la phase tardive. Ces résultats ont été normalisés en fonction de l'expression de l'ARN ribosomal *18S*. Ces résultats démontrent qu'il n'y a pas de différence entre les génotypes au niveau des marqueurs de différenciation de la phase précoce, soit *Runx2* et *Sp7*. Cette même tendance est remarquée au niveau du marqueur *Coll1A* entre les *Cftr* *+/+* et les *Cftr* *-/-*. Néanmoins, nous remarquons une différence du niveau d'expression génique du marqueur *Alp1* et ce aux jours 0, 21 et 28. En effet, les souris *Cftr* *-/-* expriment significativement moins ce marqueur à ces temps. De plus, on a également noté une différence significative entre les génotypes au niveau du marqueur *OCN* au jour 14. De ce fait, nous postulons que les souris *Cftr* *-/-* atteignent le maximum d'expression de l'*OCN* de façon prématurée comparées au *Cftr* *+/+*. De plus, non seulement l'*Alp1* et l'*OCN* ont une expression significativement différente entre les souris *Cftr* *-/-* et *Cftr* *+/+* mais, ces deux marqueurs varient de façon inverse. En effet, l'expression de *Alp1* est diminuée alors que celle de l'*OCN* augmente comparée aux *Cftr* *+/+*.

En résumé, ces résultats suggèrent que les Ob ont un défaut dans leur différenciation, mais seulement au niveau de certains marqueurs intermédiaires et tardifs.

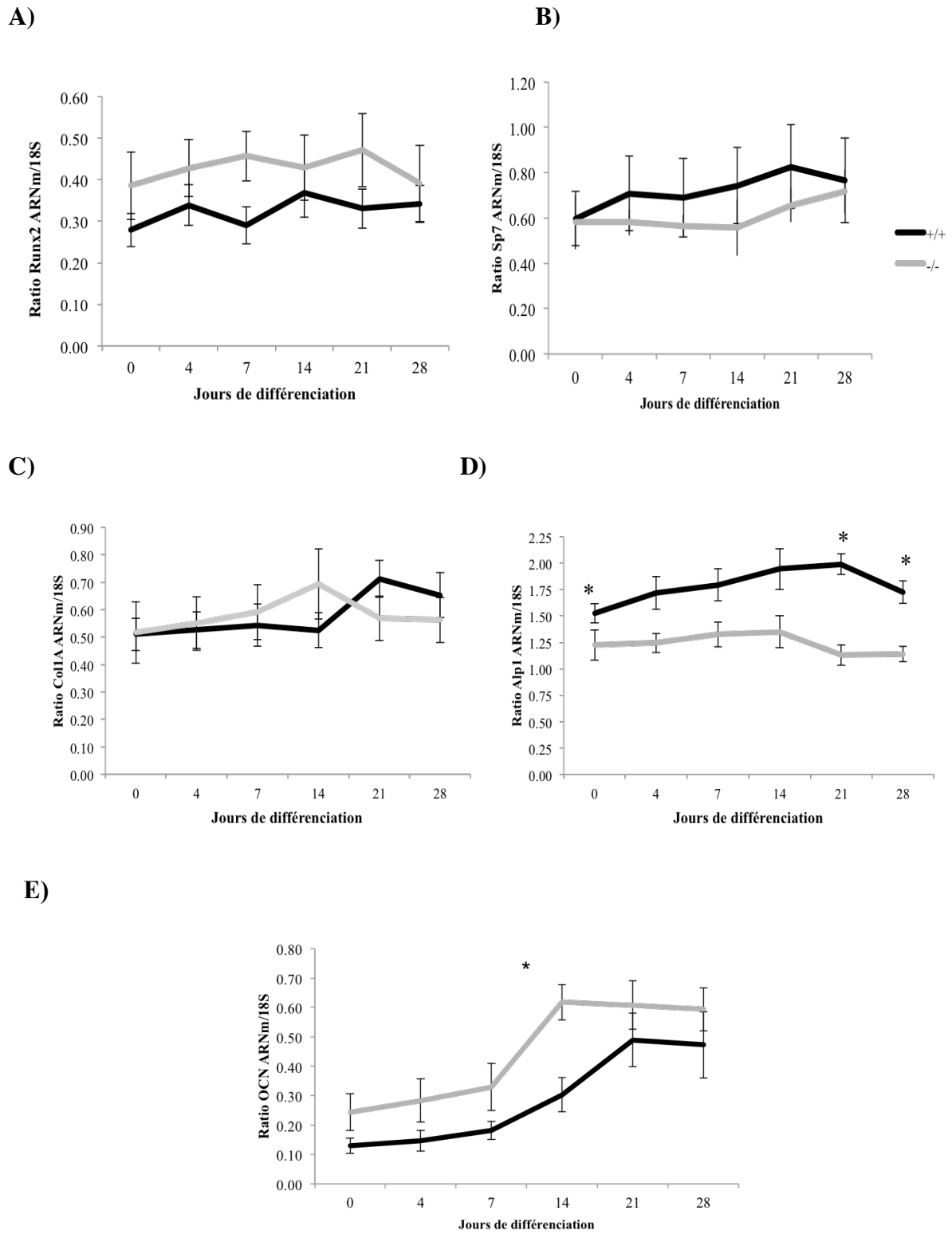


Figure 19: Impact de l'absence du *Cftr* sur la différenciation des Ob dérivés de la MO. Suite à une extraction des ARN totaux, l'expression de multiples facteurs de différenciation a été déterminée par RT-PCR au niveau d'Ob

dérivés de la MO de souris *Cftr* *+/+* et *Cftr* *-/-* à différents temps de maturation. Ces résultats ont été normalisés en fonction de l'expression de l'ARN ribosomal *18S*. **Figure 19A** et **B** représentent le patron génique des marqueurs *Runx2* et *Sp7* respectivement, qui sont deux marqueurs de la phase précoce de la différenciation ostéoblastique, alors que les **Figure 19C** et **D** démontrent les facteurs *Colla* et *Alp1* respectivement, qui sont deux facteurs de la phase intermédiaire. Finalement, la **Figure 19E** représente le facteur *OCN* qui est un facteur de la phase tardive. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 12 à 15 souris *Cftr* *+/+* et de 8 à 12 souris *Cftr* *-/-* âgées de 10 à 12 semaines. Le test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les moyennes. * $p < 0.01$

Puisque la différenciation ostéoblastique semble être perturbée au niveau de l'expression d'*Alp1* et d'*OCN*, nous avons vérifié si cette tendance se confirme au niveau de leurs fonctions. Nous avons donc étudié le niveau d'activité de la ALP (**Figure 20A**) et la capacité de minéralisation des Ob par une coloration de rouge alizarine (**Figure 20B**) et ce, tout au long de la maturation des Ob dérivés de la MO. Nous avons observé à la **Figure 20A** que les souris *Cftr* *-/-* ont tendance à avoir une activité ALP moins importante que les contrôle, et ce aux jours 21 et 28. Ce patron d'activité de ALP est le même que celui de l'expression génique représenté à la **Figure 19D**. De plus, les résultats de la **Figure 20B** illustrant la concentration de rouge alizarine obtenue par solubilisation, démontrent un profil de minéralisation différent entre les souris *Cftr* *+/+* et *Cftr* *-/-*. Nous pouvons remarquer que les souris FK semblent non seulement minéraliser de façon prématurée, mais également de façon excessive comparativement au contrôle. Par le fait même, il y a une différence significative dans la concentration de rouge alizarine au jour 28 entre les deux génotypes. Ainsi, nous postulons que la déplétion génique du *Cftr* exerce une altération des fonctions ostéoblastiques telles que l'activité de la ALP et la minéralisation.

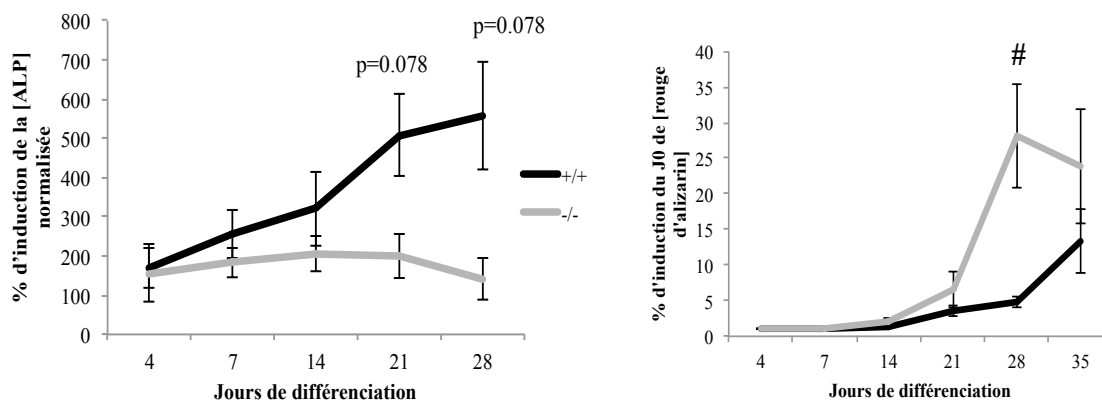


Figure 20: Impact de l'absence du *Cftr* sur la fonction ostéoblastique. Une coloration de rouge alizarine et la mesure de l'activité de ALP ont été faites *in vitro* sur des cultures d'Ob dérivés de la MO à multiples temps de différenciation. (A) Niveau d'activité enzymatique de l'ALP *in vitro*. Ces résultats représentent la moyenne des pourcentages d'induction par rapport au jour 0 de l'activité de l'ALP normalisée par la quantité de protéines d'Ob présente dans le puit testé \pm SEM de 11 souris *Cftr* +/+ et 5 souris *Cftr* -/-. (B) Résultats de la solubilisation par acide acétique du rouge alizarine obtenue à partir de 14 souris *Cftr* +/+ et 6 souris *Cftr* -/-. Ces résultats représentent la moyenne des pourcentages d'induction de la concentration du colorant par rapport au jour 0 \pm SEM. Le test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les moyennes. # $p < 0.05$.

4.4.3 Impact de l'absence du *Cftr* sur le profil cellulaire immunitaire

4.4.3.1 La moelle osseuse

Tel que mentionné dans la section 1.2.2.1, les Ob jouent un rôle important dans la régulation et le maintien de l'hématopoïèse et, de ce fait, dans la leucopoïèse [101]. En effet, les Ob semblent réguler la composition et le nombre de cellules retrouvées dans la MO. Puisque dans notre cas il semble y avoir un défaut ostéoblastique, il nous paraissait intéressant d'aller étudier si cette perturbation avait un effet sur le profil cellulaire de la MO. Pour ce faire, une analyse de cytométrie en flux a été faite sur la lignée leucocytaire de la MO des souris *Cftr* +/+ et *Cftr* -/-. La MO était extraite des deux fémurs et tibias et séparée au Ficoll afin d'obtenir seulement la lignée leucocytaire et non pas les cellules mononuclées. Au départ, les cellules étaient toutes marquées avec l'anticorps CD45 qui est l'antigène commun des leucocytes. Le pourcentage de chaque type cellulaire était rapporté sur le nombre total de cellules CD45 positives. À la **Figure 21**, nous pouvons constater une diminution significative de 39.1% du nombre de lymphocytes T, 44.6% du nombre de macrophages et 43.9% de cellules dendritiques (DC) chez les souris *Cftr* -/- comparées au *Cftr* +/+. Toutefois le nombre de cellules *natural killer* (NK), de lymphocytes B et de granulocytes n'est pas affecté.

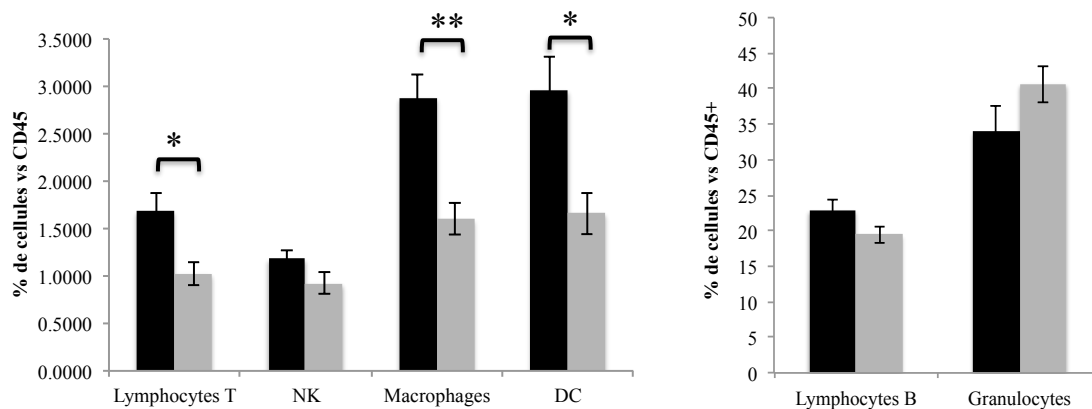


Figure 21: Profil des cellules immunitaires de la MO. Les cellules de la lignée leucocytaire isolées à partir de la MO sont marquées avec plusieurs marqueurs cellulaires, dont le CD45 qui est l'antigène commun des leucocytes. Les résultats sont exprimés en ratio du nombre de cellules marquées sur le nombre total de cellules marquées CD45. Les marqueurs utilisés sont : CD3+: lymphocytes T, CD49b: NK, F480+: macrophages, CD11c: DC, CD19+: lymphocytes B, CD115+Ly6G-: granulocytes. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM obtenue de 23 souris *Cfr* +/+ et de 13 souris *Cfr* -/-. Le test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les moyennes. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$.

Puisque le nombre de cellules immunitaires, spécifiquement les lymphocytes T, macrophages et cellules dendritiques, est diminué chez les souris *Cfr* -/-, nous avons décidé d'évaluer si cet effet était circonscrit à la MO. Nous avons donc étudié le profil de cellules immunitaires auprès de deux sites d'hématopoïèse extramédullaire, soit la rate et les ganglions. Nos résultats démontrent absence de différence entre le nombre de cellules immunitaires dans les souris FK et les souris *Cfr* +/+ au niveau de la rate (**Figure 22**) et des ganglions (**Figure 23**).

4.4.3.2. La rate

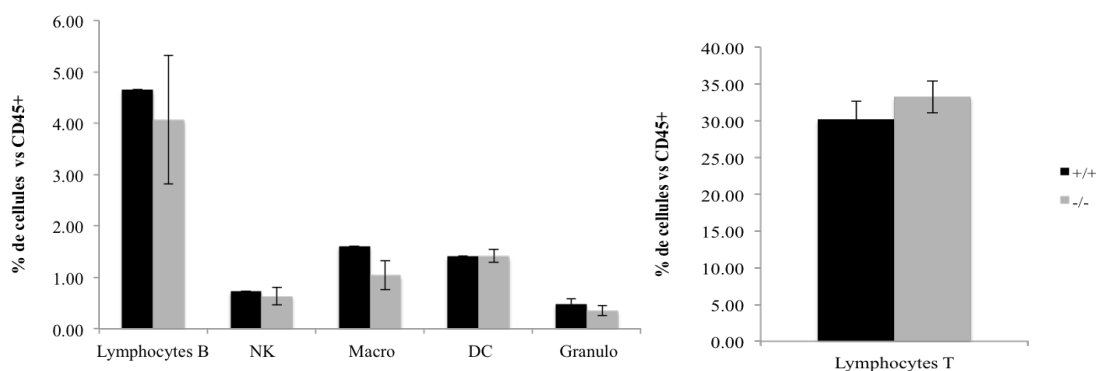


Figure 22: Profil des cellules immunitaires de la rate. Les cellules de la lignée leucocytaire isolées à partir de la rate sont marquées avec de différents marqueurs cellulaires, dont le CD45 qui est l'antigène commun des leucocytes. Les résultats sont exprimés en ratio du nombre de cellules marquées sur le nombre total de cellules marquées CD45. Les marqueurs utilisés sont : CD3+: lymphocytes T, CD49b: NK, F480+: macrophages, CD11c: DC, CD19+: lymphocytes B, CD115+Ly6G-: granulocytes. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 9 souris *Cfr* +/+ et de 10 souris *Cfr* -/- âgées de 10 à 12 semaines. Résultats non significatifs (NS).

4.4.3.3. Les ganglions lymphatiques

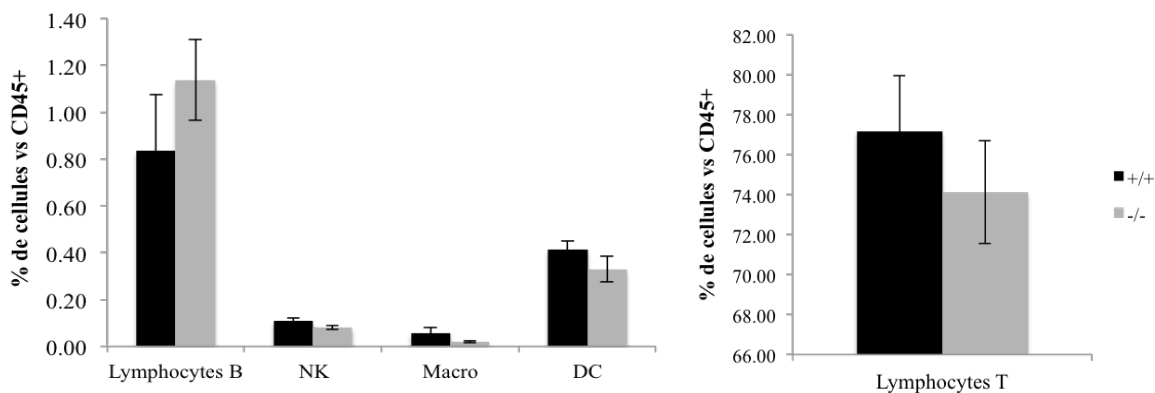


Figure 23: Profil des cellules immunitaires des ganglions lymphatiques. L'entièreté des cellules des ganglions lymphatiques axiaux est marquée avec de différents marqueurs cellulaires, dont le CD45 qui est l'antigène commun des leucocytes. Les résultats sont exprimés en ratio du nombre de cellules marquées sur le nombre total de cellules marquées CD45. Les marqueurs utilisés sont : CD3+: lymphocytes T, CD49b: NK, F480+: macrophages, CD11c: DC, CD19+: lymphocytes B, CD115+Ly6G-: granulocytes. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 9 souris *Cfr* +/+ et de 10 souris *Cfr* -/- âgées de 10 à 12 semaines. Résultats non significatifs (NS).

Chapitre 5. Discussion

Ce projet de maîtrise comportait trois volets. Dans un premier temps, il avait pour objectif de confirmer que le phénotype osseux des souris *Cftr* *-/-* est causé par l'absence du CFTR et non par d'autres facteurs pathogéniques tels que l'hypogonadisme, la malnutrition ou la malabsorption. Dans un deuxième temps, il visait à déterminer la présence du CFTR au niveau des cellules osseuses soit les Ob et les Oc et d'étudier l'impact de l'absence de cette protéine sur leur différenciation et leur fonction. Finalement, il avait aussi pour but d'investiguer l'impact de l'absence du CFTR sur la niche leucopoïétique de la MO.

5.1 Caractérisation du phénotype osseux

La présence d'une densité osseuse diminuée chez les patients FK a d'abord été rapportée en 1979 par Mischler *et al.* [101]. Depuis ce temps, quelques études ont caractérisé la pathologie osseuse principalement dans deux modèles animaux soit la souris et le cochon. Dans cette étude, nous avons mesuré plusieurs paramètres de quantité et de qualité osseuse chez des souris invalidées génétiquement pour le CFTR. Récemment, il a été rapporté que les souris $\Delta F508$ avaient un poids corporel diminué comparé aux contrôles [90]. Ces résultats corroborent ceux de l'équipe de Dif *et al.* qui ont démontré une diminution de 10.3% du poids corporel chez des souris *Cftr* *-/-* âgées de 3 semaines et ceux de l'équipe de Haston *et al.* qui ont démontré une diminution de 34.3% chez des souris de 12 semaines [48, 76]. Ces résultats sous-entendent que les souris ont un défaut de croissance dès un jeune âge et que celui-ci s'aggrave avec l'âge. Bien que nos résultats ont démontré une diminution de la masse corporelle moins importante entre les souris *Cftr* *+/+* et *Cftr* *-/-*, soit de 18%, nos résultats confirment que ces souris souffrent d'un trouble de croissance. Le pourcentage de diminution de la masse corporelle dans l'étude de Haston *et al.* est presque deux fois plus élevé que le nôtre pour des souris du même âge et de la même souche génétique. Nous postulons que ceci pourrait être dû au fait que nos souriceaux *Cftr* *-/-* reçoivent le PegLyte™ comme eau de boisson et que celui-ci est mélangé avec leur nourriture de base dès la 2e semaine de vie. De plus, le sevrage des souriceaux *Cftr* *-/-* n'est fait qu'après 4 à 5 semaines de vie afin de maximiser la survie des souris. De ce fait, il se peut que ces facteurs aient aidé à la prise de

poids de nos souris. De plus, nos résultats indiquent que le système squelettique est affecté puisque nous avons observé une longueur fémorale moindre comparé leurs contrôles. Ce défaut ne semble pas être relié à une malnutrition puisque nos résultats démontrent que les souris FK ont une consommation alimentaire comparable aux souris *Cftr* +/+. Rosenberg *et al.* ont étudié le retard de maturation des souris *Cftr* -/- et ont également montré que celui-ci n'était pas dû à un défaut de consommation alimentaire [102]. En effet, ils ont démontré que les souris *Cftr* -/- avaient un taux circulant d'IGF-1 significativement plus bas que les *Cftr* +/+, ce qui pourrait expliquer le problème de croissance puisque cette hormone anabolique est indispensable à la croissance longitudinale des os. Cette diminution d'IGF-1 sérique chez la souris *Cftr* -/- a également été notée par l'équipe de *Haston et al* [87].

D'autre part, ce retard de maturation se voit également au niveau de leur composition corporelle. En effet, nos résultats montrent que les souris *Cftr* -/- ont une diminution de 15.4% et de 33.3% au niveau de leur masse musculaire et adipeuse. Ceci pourrait aussi être relié à un défaut du métabolisme énergétique. Une étude de *Bederman et al.* a justement étudié la lipogénèse chez les souris $\Delta F508$ et a rapporté que ces souris ont une lipogénèse hépatique et une expression d'enzymes lipogéniques dans le foie moindre que leurs contrôles [103]. Ces souris ont une faible masse adipeuse en raison d'une faible absorption de triglycérides au niveau du tissu adipeux [103]. D'autre part, il est intéressant de constater que dans notre étude et celle de *Haston et al.* la diminution de la densité osseuse semble refléter la diminution de la masse corporelle [87]. De plus, le pourcentage de diminution de la masse musculaire et de la BMD fémorale est similaire dans notre étude. Or, il est bien connu que la force osseuse est intimement liée avec la force musculaire. Les muscles squelettiques sont un des plus grands déterminants de la force osseuse. On peut donc postuler que la diminution de la masse musculaire pourrait également contribuer à la fragilisation de l'os [104].

Toutefois, afin de bien caractériser le phénotype osseux de notre modèle de souris, nous avons poursuivi par des analyses de DEXA scan et de μ -CT. Le Tableau 3 représente une compilation des données publiées entre 2004 et 2012 portant sur le phénotype osseux de différents modèles murins FK et les compare avec les données du présent projet

Modèles et background génétique	Mutation	<i>Cfir</i> ARNm	Âge	Poids	BMD	BMC	BV/TV trabéculaire	Tr.Th	Tb.No	Tr.Sp	Référence
Cftr ^{tm1Unc} /Cftr ^{tm1Unc} FABP- <i>hCfir</i> (+/+) C57BL/6	Remplacement exon 10, correction du CFTR au niveau de l'intestin	Knockout complet sauf au niveau de l'intestin	14 semaines	-	↓ 9% (mâle) ↓ 6% (femelle) fémorale	↓ 25% (mâle) ↓ 22% (femelle) fémorale	↓ 28% (mâle) ↓ 50% (femelle)	↓ 20% (mâle) ↓ 17% (femelle)	↓ 9% (mâle) ↓ 37% (femelle)	↑ 14% (mâle) et ↑ 72% (femelle)	[92]
Cftr ^{tm1Unc} Mixed background	Remplacement exon 10	Knockout complet	3 semaines	-	↓ 20% fémorale	↓ 48% fémorale	-	-	-	-	[74]
Cftr ^{tm1Unc} BALB/c	Remplacement exon 10	Knockout complet	12 semaines	↓ 34.3% poids corporel	↓ 33.7% BMD fémorale ↓ 25.5% BMD lombaires	-	↓ 59.3%	↓ 12.8%	↓ 54.4%	↑ 28.3%	[87]
Cftr ^{tm1Eur} C57BL/6	ΔF508 dans l'exon 10	Expression <i>Cfir</i> muté	6 à 8 semaines	-	Aucune différence BMD fémorale	-	↓ 16.4%	-	↓ 17.3%	-	[86]
Cftr ^{tm1Eur} FVB	ΔF508 dans l'exon 10	Expression <i>Cfir</i> muté	6 semaines	-	↓ 14% (mâle) et 22% (femelle) BMD fémorale	-	↓ 40% (mâle) et 36% (femelle)	↓ 17% (mâle) et 9% (femelle)	-	↑ 53% (mâle) et ↑ 69% (femelle)	[88]
Cftr ^{tm1Kth} C57BL/6J	ΔF508 dans l'exon 10	Expression <i>Cfir</i> muté	11-15 semaines	-	Aucune différence BMD fémorale	-	-	↓ 8.6%	-	-	[86]

Cftr ^{tm1Unc} BALB/c	Remplacement exon 10	<i>Knockout</i> complet	10-12 semaines	↓18% poids corporel ↓15% masse musculaire ↓33% masse grasse	↓14% fémorale ↓8% lombaires	↓20% fémorale	↓49%	↓7%	↓45%	↑42%	Résultats de ce mémoire
----------------------------------	-------------------------	----------------------------	-------------------	---	--------------------------------------	------------------	------	-----	------	------	-------------------------------

Tableau 3: Compilation des données publiées et les données de ce travail de recherche sur le phénotype osseux des différents modèles murins FK. BV/TV; Volume osseux/Volume total, TrTh; Épaisseur trabéculaire, TrNo; Nombre de travées, Tr.Sp; Séparation trabéculaire

Nous pouvons remarquer que le phénotype osseux varie selon le modèle utilisé en raison de l'expression du CFTR. Les souris $Cftr^{tm1Unc}/Cftr^{tm1Unc}$ ont une invalidation complète du CFTR tandis que les souris $Cftr^{tm1Eur}/Cftr^{tm1Eur}$ et $Cftr^{tm1Kth}/Cftr^{tm1Kth}$ expriment le CFTR muté $\Delta F508$. De plus, le niveau d'affectation diffère par rapport à l'âge des souris. En comparant nos données avec celles déjà publiées, nous pouvons constater que notre phénotype osseux s'apparente à celui rapporté dans les études précédentes [76, 87, 88]. Plus précisément, le phénotype osseux des souris FK démontre une atteinte de l'os trabéculaire et une diminution de la densité osseuse fémorale. Bien que les pourcentages de diminution diffèrent, ceci peut s'expliquer par la disparité dans les modèles murins, leur souche génétique et leur âge. Cependant, le niveau d'affectation de l'os cortical n'est pas grandement étudié. Seuls Haston *et al.* et Dif *et al.* ont mesuré l'épaisseur de l'os cortical et ont rapporté une diminution de celui-ci chez les souris $Cftr^{-/-}$ [76, 87]. Or, nos analyses de μ -CT nous ont permis de déterminer que le volume et l'épaisseur de l'os cortical ne sont pas affectés dans notre modèle murin puisque nous n'avons détecté aucune différence entre les souris $Cftr^{-/-}$ et $Cftr^{+/+}$. Il s'agit d'une donnée importante puisque nous savons que l'os trabéculaire est plus fortement remodelé que l'os cortical. Nous pouvons donc supposer un possible défaut au niveau du remodelage osseux chez les souris $Cftr^{-/-}$. Cette situation s'apparente à ce qui est observé chez les femmes préménopausées. En effet, la perte osseuse des femmes ménopausées se fait en deux étapes soit durant la préménopause et à la ménopause. La préménopause se déroule entre 21 et 50 ans et se caractérise par la perte graduelle du tiers de l'os trabéculaire. La perte de l'os cortical débute, quant à elle, plus tardivement, soit 5 ans avant la ménopause [105]. Comme nous avons étudié les souris à un âge bien précis qui correspond à la maturité squelettique, nous ne pouvons exclure la possibilité que l'os cortical sera éventuellement affecté avec le vieillissement des souris. Néanmoins, nos résultats suggèrent qu'en absence du CFTR, l'os trabéculaire est atteint plus précocement.

5.2 Étude de certains facteurs pathogéniques

L'impact de la diminution de la BMD et la pathogenèse de la CFBD est encore très mal compris. Plusieurs facteurs jouent contre la santé et le bon développement osseux des patients

FK. Parmi ces facteurs, on trouve la déficience en vitamine D, la malnutrition, la prise de glucocorticoïdes, l'hypogonadisme et l'inflammation systémique.

Le premier volet de notre étude aurait pour but de confirmer que le phénotype osseux des souris *Cftr* ^{-/-} n'était pas causé par d'autres facteurs pathogéniques tels l'hypogonadisme, la malnutrition ou la malabsorption, mais bien par l'absence du CFTR. Pour se faire, nous avons étudié si les souris *Cftr* ^{-/-} souffraient d'hypogonadisme, de malnutrition et de malabsorption. Les résultats de la **Figure 15A** démontrent une absence de différence dans la concentration sérique de β -estradiol entre les femelles *Cftr* ^{-/-} et *Cftr* ^{+/+}. Cette absence de différence a également été relevée chez les mâles (**Figure 15B**). Ces résultats suggèrent donc que les souris *Cftr* ^{-/-} ne souffrent pas d'hypogonadisme. De ce fait, ceci ne peut pas être considéré comme un facteur pathogénique de la maladie osseuse dans notre modèle animal. D'autre part, nous avons étudié la consommation quotidienne de nourriture afin d'étudier la présence de malnutrition (**Figure 16A**). Nous avons constaté que la prise alimentaire quotidienne n'est aucunement affectée par le génotype et donc par l'absence du *Cftr*. Ces résultats corroborent les données déjà publiées par Rosenberg *et al.* [102] qui ont étudié la malnutrition dans l'optique de comprendre le retard de développement chez les souris FK. Leurs observations ont démontré que non seulement les souris *Cftr* ^{-/-} (*Cftr* ^{*tm1Unc*}) âgées de 5 à 7 semaines ne souffraient pas de dénutrition, mais que les souris mâles mangeaient significativement plus que les contrôles, ce que nous n'avons pas observé dans notre étude. Ces données ont également été confirmées dans une étude de Bijvelds *et al.* portant sur l'absorption des lipides chez les souris FK démontrant que les souris *Cftr* ^{-/-} ont une prise alimentaire comparable aux souris contrôles [106]. Par contre, ce même article documente que les souris FK présentent une plus grande quantité de lipides dans leurs fèces que les WT. Nous pouvons donc constater que ce portrait est similaire au nôtre puisque les résultats de la **Figure 16B** démontrent une augmentation de la masse des lipides fécaux chez les souris *Cftr* ^{-/-} comparées aux *Cftr* ^{+/+}. Ceci nous amène à postuler que les souris *Cftr* ^{-/-} souffrent d'une malabsorption qui pourrait avoir un impact négatif sur le métabolisme osseux. La présence d'une stéatorrhée est généralement associée à une insuffisance pancréatique. Or, la plupart des modèles murins, dont le modèle est *Cftr* ^{*tm1Unc*}, ne développent pas de maladie pancréatique [107, 108]. De ce

fait, il est stipulé que cette malabsorption peut être expliquée par une variation subtile du pH duodénal qui a d'ailleurs été démontrée chez la souris *Cftr*^{-/-} [106, 109].

Comme nous avons observé une malabsorption lipidique, nous ne pouvons exclure la possibilité d'une malabsorption d'autres nutriments importants pour une santé osseuse optimale tels que les vitamines liposolubles, le calcium et les protéines. Cette malabsorption pourrait donc exercer un effet négatif sur la santé osseuse. Cependant, une étude de Haston *et al.* [87] a déjà démontré que ces souris ne souffrent pas de déficience en vitamine D, et ce, dans le même modèle murin que le nôtre (i.e. *Cftr*^{*tm1Unc*}). De plus, de multiples études ont déjà réfuté l'implication de la vitamine D dans la pathologie osseuse [110, 111]. Dans le cas du calcium, les données de Gawenis *et al.* [112] portant sur l'analyse de l'absorption du calcium intestinal démontre que ce processus n'est pas altéré chez les souris *Cftr*^{*tm1Unc*}. À ce jour, il n'existe toujours pas de données sur l'absorption des protéines chez les souris FK. Ceci resterait donc à vérifier puisque la malnutrition protéino-énergétique pourrait avoir un certain impact sur la santé osseuse puisque la matrice de l'os est fortement constituée de protéines.

En résumé, notre étude permet de raccourcir la liste de facteurs pathogéniques potentiels de la maladie osseuse de la FK. Ainsi, nous pouvons désormais exclure l'hypogonadisme et la malnutrition de cette liste. Toutefois, un certain degré de malabsorption combiné à un désordre hormonal (i.e. diminution des niveaux sériques d'IGF-1 [101]) ainsi que d'autres facteurs n'ayant pas encore été investigués en lien avec l'os (i.e. activité physique des souris, métabolisme énergétique) pourraient contribuer au phénotype osseux. Finalement, il n'est pas exclu que l'absence du CFTR, un facteur pathogénique omniprésent, pourrait venir exacerber l'impact des autres facteurs. Cette hypothèse reste à vérifier dans des investigations futures.

5.3 Analyses de l'expression du CFTR par les cellules osseuses dérivées de la MO

Puisque le phénotype osseux présent chez nos souris ne semble pas être expliqué en totalité par la présence d'autres facteurs pathogéniques, nous avons émis l'hypothèse que le CFTR a une implication dans la maladie osseuse et que son absence exerce un impact négatif sur les cellules osseuses. D'ailleurs, son implication dans le système osseux commence à être de plus

en plus étudié [81,87]. Par contre, l'expression du CFTR par les cellules osseuses n'a pas encore été bien établie. Tel que mentionné à la 1.4.4.2, il a déjà été démontré que le CFTR chez l'humain est exprimé autant par les Ob que par les Oc [91]. Par contre, chez la souris il a été documenté que le *Cftr* est seulement exprimé par les Ob et non par les Oc dérivés de la MO [89]. À la lumière de ces disparités, nous avons décidé de confirmer ou non si le CFTR est exprimé par les cellules osseuses dans notre modèle murin. De plus, dans les Ob, nous avons vérifié si l'expression du *Cftr* variait par rapport à leur niveau de différenciation, ce qui n'avait jamais été démontré auparavant et peut nous donner un indice sur l'importance biologique de cette protéine à un stade cellulaire précis. La **Figure 17A** représente l'expression protéique des Ob dérivé de la MO de 0 à 28 jours. Nous pouvons constater que non seulement les Ob expriment le CFTR, tel que démontré par Stalvey *et al.* [89], mais que son expression augmente avec le niveau de différenciation de la cellule. Cette notion est soutenue par les résultats d'ARNm démontrant la même tendance, soit que le *Cftr* est plus fortement exprimé par l'Ob différencié que par les cellules stromales non-différenciées. De ce fait, nous constatons que le CFTR jouerait un rôle dans la maturation de l'Ob et que l'absence de celui-ci affecterait plus fortement l'Ob différencié. En effet, l'expression du CFTR est tissu et cellules spécifiques et est régulée par le niveau de développement tissulaire et cellulaire. Bien que la régulation de l'expression temporelle du CFTR n'est pas tout à fait élucidée, plusieurs mécanismes pourraient expliquer la spécificité tissulaire ainsi que le niveau d'expression de cette protéine dont la régulation transcriptionnelle par les facteurs cis-régulateurs et la régulation post-traductionnelle par les micro-ARN (miARN) [113]. L'expression du CFTR est reconnue comme étant moins prononcée au niveau des cellules non épithéliales, mais son effet est tout de même non négligeable. Puisque les Ob ne sont pas considérées comme des cellules épithéliales, nous supposons que son niveau d'expression est moins important comparativement aux cellules épithéliales telles que les cellules intestinales. En effet, des observations antérieures ont démontré que l'expression du CFTR est de 200 à 400 fois plus faible dans les cellules immunitaires (neutrophiles) que dans les cellules épithéliales intestinales [114]. Malgré sa faible expression, les neutrophiles demeurent grandement affectés par l'absence du CFTR, ce qui se répercute par un défaut de leur fonction phagocytaire et sécrétoire [115]. De plus, une étude de *Painter et al.* a démontré

que l'expression du CFTR était augmentée pendant l'induction de la différenciation des cellules leucémiques promyélocyaires de la lignée cellulaire HL-60 en neutrophiles [116]. De ce fait, les auteurs constatent que le CFTR aurait un rôle potentiel dans la fonction des neutrophiles matures [116]. Toutefois, ceci ne serait pas le cas pour tous les types cellulaires. En effet, une étude de Strong *et al.* a permis de montrer, chez l'humain, que l'expression du CFTR est plus forte au niveau de la crypte de l'épithélium intestinal et que celle-ci diminue vers la villosité où la cellule est plus différenciée [117]. Au contraire, une étude *in vitro* de Sood *et al.* a rapporté que l'expression du CFTR augmente de 10 fois avec la différenciation cellulaire au niveau des lignées de cellules intestinales Caco-2 et HT-29 [118]. Compte tenu de la disparité au niveau des modèles *in vivo* vs. *in vitro*, il serait donc intéressant d'investiguer si le niveau d'expression augmente également avec la différenciation ostéoblastique dans un modèle *in vivo*.

D'autre part, l'analyse de nos images de microscopie des différents stades de différenciation ostéoblastique (**Figure 17A**) indique que l'expression du *CFTR* n'est pas circonscrite à la membrane, telle sa localisation classique, mais semble être plutôt disséminée dans le cytoplasme. Or, nous ne pouvons exclure que le CFTR soit également présent au sein d'organelles bien précises de l'Ob différencié. En effet, la technique d'immunofluorescence utilisée marque le CFTR partout dans la cellule sans égard à sa localisation organellaire. Un double immunomarquage avec un anticorps dirigé contre le CFTR et un anticorps marquant des organelles précis nous permettrait d'avoir une idée plus précise du patron intracellulaire d'expression du CFTR ostéoblastique. Tel que discuté à la section 1.3.2.2, le CFTR est beaucoup plus qu'un simple canal, celui-ci fait partie de nombreuses interactions protéine-protéine dont celle avec le NHERF1 [59]. L'association CFTR-NHERF1 pourrait jouer un grand rôle dans l'ostéogenèse puisque de multiples études ont démontré que l'absence de la protéine PDZ NHERF1 chez la souris cause une ostéomalacie caractérisée par un défaut de minéralisation [119]. En effet, il est postulé que le NHERF1 coopère avec le PTHR1 dans les Ob matures afin d'augmenter leur minéralisation [120]. Dans l'optique que les Ob matures expriment le CFTR et que celui-ci n'est pas présent chez les souris *Cfir* *-/-*, nous postulons qu'il pourrait avoir un impact négatif sur la signalisation NHERF1-PTH1 et de ce fait sur la formation osseuse. Ceci reste néanmoins à être confirmé.

Par ailleurs, nous avons également confirmé que les Oc dérivés de la MO n'expriment pas le *Cftr* chez la souris. Ces résultats sont en accord avec ceux de l'article de Stalvey *et al.* [89]. Ce résultat nous laisse supposer que l'absence du *Cftr* n'a pas d'impact direct sur l'Oc puisque cette cellule n'exprime pas cette protéine.

5.4 Impact de l'absence du *Cftr* sur les cellules osseuses

5.4.1 Profil de différenciation des Oc dans un modèle murin *Cftr* *-/-*

Jusqu'à présent, les données sur les Oc et leur activité sont très divergentes. L'étude de Dif *et al.* portant sur un modèle murin *Cftr* *-/-* a rapporté, par des mesures histomorphométriques sur des souris âgées de 3 semaines, qu'il y avait moins d'Oc au niveau de l'os trabéculaire chez les souris *Cftr* *-/-* comparées aux souris contrôles, mais que la différence se trouvait plutôt au niveau de l'os cortical qui avait un nombre plus élevé d'Oc [76]. Puisque cette étude l'os cortical était plus fortement affecté et avait une plus forte diminution de la densité minérale comparée à l'os trabéculaire, les auteurs ont proposés que ceci était causé par l'augmentation du nombre d'Oc. Par contre, puisque ces souris étaient encore à un très jeune âge et n'avaient pas atteint une maturité osseuse, ces données doivent être interprétées avec prudence [76]. L'équipe de *Haston et al.* a reproduit cette étude, mais avec des souris âgées de 8, 12 et 28 semaines [87]. Celle-ci a permis d'étudier l'ostéopénie tout au long du développement squelettique de la souris. Cette équipe a permis de montrer une augmentation significative du nombre d'Oc TRAP+ par histochimie au niveau du fémur des souris *Cftr* *-/-* à 28 semaines seulement. Cependant, aucune différence n'était observée chez les souris de 8 et 12 semaines. D'autres études ont analysé ces données ostéoclastiques dans le même modèle murin et n'ont trouvé aucune différence entre le nombre d'Oc des souris FK et contrôles [88, 92]. Une étude de Le Henaff *et al.* a démontré une augmentation du nombre d'Oc dans le modèle F508del *Cftr*^{tm1Eur} et ce, à seulement 10 semaines de vie et non pas à 6 ou 14 semaines [90]. En résumé, le portrait n'est pas très clair en ce qui a trait au nombre d'Oc dans les modèles murins de FK.

Ces études rapportent des décomptes d'Oc TRAP+ par analyses histologiques. Bien que ce paramètre reflète le nombre d'Oc matures, ces résultats ne nous informent pas directement sur le processus de différenciation ostéoclastique. Il nous paraissait donc intéressant de vérifier

l'impact de l'absence du CFTR sur la différenciation des Oc à partir de la MO *in vitro*. Nos analyses de cytométrie en flux ne démontrent différence dans le nombre d'OCP et d'Oc matures entre les souris *Cftr* $-/-$ et les souris *Cftr* $+/+$. Ces observations sont d'autant plus soutenues par nos résultats de coloration TRAP qui ne démontrent aucune différence dans le nombre d'Oc matures entre les génotypes. Ce résultat va à l'encontre de l'étude de Stalvey *et al.* où les auteurs ont rapporté une augmentation du nombre d'Oc dérivés de la MO chez les souris *Cftr* $-/-$ comparativement aux souris *Cftr* $+/+$ [89]. Toutefois, il est important de noter que la culture d'Oc dérivée de la MO utilisée pour cette étude était différente de la nôtre. En effet, les auteurs ont utilisé des Oc qui étaient cocultivés avec des Ob et des MSCs de la MO, qui avaient comme rôle d'être la source de RANKL et de M-CSF, deux facteurs indispensables à l'ostéoclastogénèse et la différenciation ostéoclastique. En revanche, notre culture d'Oc consistait à isoler la lignée de monocytes-macrophages de la MO et d'ajouter *in vitro* le RANKL et le M-CSF. En résumé, l'expérience de Stalvey *et al.* permet de conclure à une ostéoclastogénèse augmentée chez la souris *Cftr* $-/-$, mais que celle-ci pourrait être expliquée par un défaut ostéoblastique qui stimule la différenciation des Oc [89]. Toutefois, nos résultats permettent de conclure qu'intrinsèquement, la différenciation ostéoclastique n'est pas altérée chez les souris FK, et ce, indépendamment des Ob. Il serait donc intéressant d'étudier comment des Oc provenant d'une souris *Cftr* $-/-$ réagiraient dans un système de coculture avec des Ob WT. Par ailleurs, toutes ces études portent sur le nombre d'Oc, mais jamais sur le niveau d'activité de résorption osseuse des Oc. Chez les patients FK, il y a déjà été rapporté que les cavités de résorption des Oc ont une surface d'érosion significativement plus élevée [93]. De ce fait, il serait également important de déterminer si leur activité est bien représentative de leur nombre ou encore si les Oc isolés de souris FK présentent une activité de résorption augmentée.

5.4.2 Profil de différenciation des Ob dans un modèle murin *Cftr* $-/-$

Le couplage entre la résorption et la formation osseuse qui permet le remodelage « équilibré » de l'os normal exige la coordination du recrutement et de l'activité des Oc avec ceux des Ob. En effet, les Ob jouent un rôle majeur dans l'ostéoclastogénèse, la différenciation ostéoclastique et le contrôle de la résorption osseuse [15]. Dans un système tel que le nôtre,

où il y a présence d'un phénotype osseux ostéopénique, mais où les Oc ne semblent pas présenter de défaut intrinsèque, il nous semblait pertinent de regarder du côté des Ob. De plus, nous avons déjà identifié que ces cellules ostéoformatrices expriment le CFTR et ce, de façon progressive lors de la maturation ostéoblastique (17 A et B). Pour ces raisons, nous avons postulé que la déplétion génique du CFTR dans un modèle murin exerce un impact négatif sur le métabolisme osseux en altérant le processus de différenciation ostéoblastique et les fonctions de ces cellules. Nos résultats de RT-PCR de la **Figure 19** reflètent un défaut dans la différenciation ostéoblastique, au niveau de la phase intermédiaire à tardive. Les analyses démontrent que les gènes *Runx2* et *Sp7*, qui sont des marqueurs de la phase précoce, ainsi que *Coll1A*, qui est un marqueur de la phase intermédiaire, ne sont pas affectés. Par contre, les marqueurs *Alp1* et *OCN* sont affectés de façon significative. Toutefois, nous pouvons remarquer que chez les *Cftr* $-/-$ ces deux marqueurs sont affectés de façon inverse; l'expression d'*Alp1* est diminuée alors que celle de *OCN* est augmentée. Nous savons que *Alp1* est une enzyme primordiale pour la calcification en liant le phosphate de la matrice osseuse et que l'*OCN* favorise la fixation du calcium. Ces deux protéines contrôlent la déposition ordonnée des minéraux en régulant la quantité et la taille des cristaux d'hydroxyapatite formés. De plus, l'ALP stoppe les inhibiteurs de la croissance des cristaux [121]. À la lumière de nos résultats, nous pouvons donc postuler qu'il se pourrait que le défaut d'expression d'*Alp1* et d'*OCN* puisse engendrer une cristallisation défectueuse et donc une qualité osseuse amoindrie. En outre, les fonctions des Ob sont également affectées chez les souris *Cftr* $-/-$ puisque l'activité enzymatique de l'ALP est abaissée et la minéralisation se produit de façon prématurée comparée aux souris *Cftr* $+/+$. De ce fait, nous pouvons constater que le défaut n'est pas seulement circonscrit à l'expression génique, mais également au niveau des fonctions ostéoblastiques.

Plusieurs études ont démontré que le processus de formation osseuse médié par les Ob est altéré chez les souris FK [76, 90, 92]. Par contre, peu d'études ont documenté les mécanismes cellulaires pouvant expliquer ce phénomène. Une étude récente de Le Henaff a démontré que la différenciation ostéoblastique était perturbée en raison de l'augmentation de l'activité de NF- κ B et d'une diminution de la signalisation de la voie Wnt/ β -caténine dans le modèle murin $\Delta F508$ [122]. Dans cette étude, les Ob dérivés de la MO des souris $\Delta F508$ exprimaient moins

fortement les gènes *Runx2*, *Colla*, *Alp* et *OCN*, et ce, autant aux jours 1, 4 et 7. De plus, l'activité de l'ALP aux jours 7 et 14 ainsi que la minéralisation aux jours 21 et 28 étaient significativement plus faibles chez les souris FK comparées aux contrôles. D'autre part, afin de vérifier si la mutation $\Delta F508$ avait un impact sur les Ob matures, les auteurs ont fait les mêmes analyses sur des Ob isolés de l'os trabéculaire du fémur. De ce fait, ils ont trouvé que l'expression des gènes *Colla1* et *Alp* ainsi que l'activité de l'ALP étaient diminuées chez les Ob trabéculaires provenant de la souris $\Delta F508$ comparée aux contrôles. Par contre, l'expression génique de *Runx2* et *OCN* n'était pas affectée. Puisque les Ob expriment le CFTR, les auteurs ont voulu vérifier si ces cellules avaient un patron de différenciation normal lorsqu'on rajoute un correcteur de CFTR. Le développement des Ob $\Delta F508$ était normalisé en présence du correcteur, ce qui confirme que la mutation du gène CFTR induit un défaut ostéoblastique. En résumé, cette étude stipule que la mutation $\Delta F508$ du CFTR induit une diminution de l'expression des gènes ostéoblastiques dans les Ob dérivés de la MO et, de ce fait, contribue à l'altération des fonctions ostéoblastiques.

Cette étude révèle une mécanistique un peu différente de la nôtre. Dans les deux cas, l'expression génique de *Alp* et l'activité enzymatique de l'ALP sont diminuées chez les souris FK. Par contre, dans notre modèle nous n'avons pas noté de diminution dans l'expression des gènes *Runx2*, *Colla* et *OCN* contrairement aux résultats de l'étude de Le Henaff *et al.* [122]. De plus, nous avons remarqué une minéralisation prématurée chez les souris *Cftr*^{-/-} tandis leur étude a démontré une diminution dans la minéralisation chez la souris $\Delta F508$. Une raison qui pourrait expliquer la disparité dans les résultats est la différence entre les deux modèles murins utilisés. Dans notre cas les souris *Cftr*^{tm1Unc} ont une invalidation génique complète du CFTR tandis que les souris $\Delta F508$ expriment tout de même la protéine, mais mutée. D'autre part, nos analyses ont toutes été faites sur une culture d'Ob dérivé de la MO de 0 à 28 jours afin d'avoir une idée complète de la différenciation ostéoblastique. Tandis que cet article a utilisé une culture d'Ob dérivé de la MO, mais également une culture d'Ob dérivé des travées de fémur à titre de modèle d'Ob matures. Cette différence de culture cellulaire pourrait avoir un impact dans l'interprétation des données puisque la maturation ostéoblastique n'a pas été faite de la même façon. De plus, nos résultats géniques démontrent un patron d'expression tout au long de la maturation soit du jour 0 à 28 tandis que l'article de Le Henaff *et al.* ne démontre

que l'expression génique des jours 0, 4 et 7 et ensuite chez des Ob matures trabéculaires [122]. Puisque nous avons remarqué une différence dans l'expression génique de l'*OCN* au jour 14, il se pourrait que les auteurs n'aient pas vu cette différence puisque le jour 14 n'était pas étudié.

Toutefois, un portrait de différenciation similaire au nôtre a été observé par Gaur *et al.* qui ont étudié l'impact de l'inactivation de l'enzyme *Dicer* sur la formation osseuse [123]. *Dicer* est une endoribonucléase de la famille RNase III qui permet la conversion des pré-microARN en micro-ARNmature (miARN). Les mécanismes moléculaires qui contrôlent l'expression génique des Ob et qui stimulent la maturation ostéoblastique sont fort complexes. En effet, les miARN joueraient un rôle primordial dans ce processus [124]. Gaur *et al.* ont démontré qu'en absence de *Dicer* un défaut dans la formation osseuse était noté [123]. Ceci était expliqué par une ostéoblastogenèse défectueuse, mais seulement au niveau des Ob matures. En effet, ils n'ont remarqué aucune différence d'expression au niveau des marqueurs nécessaires pour l'engagement et la prolifération des Ob, soit *Runx2* et *Coll1a*. Par contre, les Ob *Dicer* *-/-* avaient une activité ALP et une expression génique d'*OCN* moins importante que les contrôles ainsi qu'une minéralisation prématurée ce qui sous-entend que *Dicer* joue un rôle dans les phases post-prolifératives, soit la maturation.

À la lumière de ces résultats, nous postulons que le CFTR aurait peut-être un rôle à jouer dans les phases post-prolifératives des Ob. Ceci semble logique puisque son expression est progressive pendant la maturation ostéoblastique. D'ailleurs, il est maintenant connu que la régulation des miARN est indispensable dans le contrôle de l'expression du CFTR. En effet, tel que mentionné dans la section 5.3, l'expression du CFTR est régulée de façon temporelle et spécifique au tissu et les miARN contrôleraient sa régulation post-transcriptionnelle [125]. De plus, il a déjà été démontré que l'absence du CFTR entraîne une altération du profil des miARN au niveau de l'épithélium bronchique [115]. Il serait donc intéressant de voir si l'absence du CFTR modifie le profil des miARN des Ob et si ceci peut expliquer les différences que nous avons observées.

5.5 Impact de l'absence du *Cftr* sur le profil cellulaire immunitaire

5.5.1 Au niveau de la MO

Bien que la fonction primaire des Ob est de sécréter la matrice ostéoïde précédant la phase de minéralisation, les Ob localisés à la surface endostale dans la MO jouent un rôle primordial dans la régulation des HSCs [126-128]. L'hématopoïèse au niveau des niches de la MO est un phénomène extrêmement complexe. Jusqu'à présent, les mécanismes de régulation et l'implication des cellules osseuses ne sont pas très bien compris. Cependant, certaines corrélations ont été documentées. En effet, une diminution du nombre d'Ob induit une diminution du nombre de HSCs [129]. Nous avons déjà démontré que la différenciation Ob est perturbée chez les souris *Cftr* *-/-*. Ainsi, ce défaut pouvait avoir un effet sur la niche ostéoblastique et conséquemment sur la niche hématopoïétique de la MO. Nous avons observé que l'absence du CFTR exerce effectivement un impact négatif sur la niche hématopoïétique de la MO qui se traduit par une diminution significative du nombre de lymphocytes T, de macrophages et de DC chez les souris FK comparées aux contrôles. Cependant, ce ne sont pas tous les types de cellules immunitaires qui sont affectées puisqu'aucune différence n'est notée dans le nombre de cellules NK, de lymphocytes B et de granulocytes entre les génotypes. Tel que mentionné précédemment, l'hématopoïèse est un phénomène hautement régulé et un déséquilibre d'un type cellulaire peut avoir un effet crucial sur ce processus. Une étude a démontré qu'une délétion des Ob était associée à une diminution des *common lymphoid progenitors* (CLPs), plus particulièrement les CLPs ayant un potentiel à devenir des cellules T [130]. Par contre, les CLPs avec un potentiel à devenir des cellules B n'étaient pas affectés. Ce genre de corrélation pourrait expliquer pourquoi nous avons trouvé un nombre de cellules T diminué chez nos souris *Cftr* *-/-*. Par contre, ceci n'explique pas pourquoi nous avons également observé un nombre réduit de macrophages et de DC. Nous savons déjà que les DC et les macrophages proviennent du même type de cellule progénitrice soit les *macrophages and DC progenitors* (MDPs)[131]. Nous pouvons donc postuler que si l'hématopoïèse est dérégulée, il se peut que l'engagement vers la lignée MDP

soit diminué comparé aux autres lignées. Les Ob sécrètent une multitude de cytokines régulatrices de l'hématopoïèse et participent à plusieurs voies de signalisation qui permettent le maintien de la niche ostéoblastique. L'une de ces cytokines est le CXCL12 (ou *stromal cell-derived factor 1* (SDF-1)) qui est un facteur primordial pour la survie des cellules progénitrices, pour la régulation du "nichage" (*homing*), de la rétention, du développement et du recrutement dans la circulation des cellules progénitrices de diverses origines et des cellules immunitaires [132]. En condition homéostatique, la concentration de cette cytokine au niveau de la MO est relativement élevée afin de maintenir les cellules progénitrices dans un état quiescent. De ce fait, un défaut dans la différenciation des Ob peut avoir des répercussions fort importantes sur leurs rôles au niveau de la MO.

D'autre part, un nouveau champ de recherche a récemment émergé, soit l'interface entre le système immunitaire et la physiologie osseuse que l'on appelle l'ostéo-immunologie. La relation entre ces deux systèmes a surtout été étudiée au niveau du lien entre les Ob et les macrophages. Il est déjà bien connu que les macrophages expriment et sécrètent des cytokines ostéoactives, des métalloprotéinases et des *bone morphogenetic proteins* [133]. En effet, une étude de Winkler *et al.* [134] suggère que la déplétion des Ob dans la MO est suivie par une perte significative d'une population de macrophages présents à la surface endostale nommée les ostéomacs. De plus, une autre étude a démontré que la relation Ob-macrophage était importante pour la formation osseuse et qu'en absence des macrophages l'ossification était significativement diminuée [135]. Nous postulons donc qu'en absence du CFTR, un défaut des Ob pourrait induire cette diminution du nombre de macrophages de la MO. Par contre, le problème ostéoblastique pourrait aussi être relié à la diminution du nombre de ces cellules phagocytaires. Une étude a rapporté qu'en absence de macrophages, la différenciation ostéoblastique était altérée, mais seulement au niveau des phases post-prolifératives, dont la maturation terminale des Ob [136]. De ce fait, il serait intéressant d'étudier la relation macrophage-Ob à l'aide d'une co-culture d'Ob *Cftr* *-/-* avec des macrophages provenant d'une souris *Cftr* *+/+* et vice versa. Ce genre d'expérience permettrait de vérifier le niveau de co-dépendance au niveau de la maturation de ces deux types cellulaires.

En résumé, nous suggérons que le défaut ostéoblastique causé par l'absence du CFTR aurait un effet négatif sur la leucopoïèse au niveau de la MO, qui à son tour, pourrait influencer la

maturation ostéoblastique. Ces résultats sont d'une importance primordiale puisque ce phénomène n'a jamais été démontré dans un contexte de FK.

5.5.2 Au niveau extramédullaire

L'hématopoïèse extramedullaire (HEM) est souvent associée à un état pathologique. Par contre, certaines études tentent de comprendre si ce phénomène est présent seulement en situation pathologique ou si l'HEM pourrait avoir lieu dans des circonstances de compensation [137]. Il y a trois situations dans lesquelles l'HEM peut avoir lieu : 1) une défaillance sévère de la MO; 2) une inflammation tissulaire; et 3) une production anormale de chemokines [137]. Puisque nous avons démontré un défaut dans l'hématopoïèse au niveau de la MO chez les souris FK, nous avons évalué s'il y avait présence d'une HEM au niveau de la rate et des ganglions lymphatiques afin de compenser pour cette altération. Nos résultats ne démontrent aucune différence dans le nombre de cellules leucocytaires entre les souris *Cftr* *+/+* et *Cftr* *-/-*. À première vue, ces résultats sous-entendent que le défaut d'hématopoïèse observé chez les souris *Cftr* *-/-* est circonscrit à la MO. La migration des cellules hématopoïétique de la MO à la circulation sanguine est critique pour l'homéostasie des organes lymphoïdes et pour le nombre de leucocytes circulants [138]. En effet, le gradient de chemokines entre le sang et les organes lymphoïdes dirige la circulation aller-retour entre la MO, le thymus, et les organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions et la rate [138]. La mobilisation est donc réglementée par la distribution et la puissance des chemokines dans la MO et en circulation. Puisque nous avons observé moins de cellules T, de macrophages et de DC au niveau de la MO des souris *Cftr* *-/-*, à deux scénarios serait possible: soit une compensation par une HEM au niveau des organes lymphoïdes secondaires (les ganglions et la rate) ou le même défaut, c'est-à-dire un nombre moindre de ces cellules, à ce niveau. Par contre, nos résultats ne démontrent ni une diminution ni une compensation par une augmentation du nombre de cellules T, macrophages et DC au niveau des ganglions et de la rate. Ainsi, nous pouvons constater que la repopulation se fait correctement dans les sites extramédullaires, mais pour quelles raisons? Malgré un nombre moindre de cellules T, de macrophages et de DC au niveau de la MO, nous postulons que ces cellules sécrètent possiblement plus de facteurs favorisant le nichage et la rétention extramédullaire des leucocytes. Nous avons étudié les macrophages de la MO de souris *Cftr* *-/-* et nous avons trouvé que ceux-ci sécrétaient plus fortement certaines cytokines, dont SDF-1

(données non montrées). Cette sécrétion plus élevée de cytokines, nécessaires notamment au nichage et à la rétention, pourrait donc contribuer à rétablir un équilibre dans le nombre de leucocytes au niveau extramédullaire et expliquer l'absence de différences entre les génotypes. De ce fait, il se pourrait donc que les cellules T et les DC issus de la MO des souris *Cftr*^{-/-} sécrètent également plus de cytokines, mais ceci reste à être investigué.

5.6 Forces et limites

Ce projet de recherche compte certaines limites, mais également des forces.

Modèle choisi: Le modèle murin *Cftr*^{tm1Unc/tm1Unc} Balb/c est un modèle qui est invalidé génétiquement pour le CFTR permettant ainsi d'étudier l'impact de l'absence de ce gène. Il est donc représentatif de certaines mutations de classe I caractérisées par l'absence du CFTR. Toutefois, nos résultats ne peuvent être généralisés aux patients porteurs d'autres classes de mutations caractérisées par la présence d'une protéine CFTR mutée. De plus, notre modèle murin possède la limite de ne pas représenter fidèlement le phénotype de la maladie humaine puisqu'il ne présente aucune atteinte pulmonaire et pancréatique à l'exception des obstructions intestinales. Néanmoins, le modèle murin est fort utile pour caractériser la pathogenèse et la pathophysiologie de la maladie osseuse puisque tout comme chez l'homme, il présente ce phénotype. Chez l'homme, la présence de multiples facteurs confondants et la difficulté d'obtenir un spécimen osseux compliquent les investigations. Pour contrer l'obstruction intestinale et assurer la survie des souris, celles-ci reçoivent du PegLyte™. Or, nous n'avons pas donné de PegLyte™ à nos souris *Cftr*^{+/+}, ce qui pourrait avoir une influence sur le phénotype osseux. Haston *et al.* ont comparé le phénotype osseux de souris *Cftr*^{+/+} recevant du PegLyte™ à celui de souris *Cftr*^{+/+} n'en recevant pas. Bien que la BMD de ces deux groupes de souris ne différait pas, les souris ayant reçu du PegLyte™ présentaient une réduction du volume osseux, du nombre et de l'épaisseur des travées osseuses [87]. Ainsi, nous ne pouvons exclure que l'ajout de PegLyte™ à la diète des souris *Cftr*^{-/-} puisse avoir accentué leur phénotype osseux. D'autre part, nous avons également étudié les souris *Cftr*^{+/-} pour certaines expériences (résultats non montrés), mais les résultats semblaient varier d'une souris à l'autre démontrant que ces souris n'étaient pas toutes affectées au même degré, ce qui renforce l'idée que le CFTR a un rôle à jouer au niveau de l'os. On a longtemps cru que les porteurs d'un allèle CFTR dysfonctionnel sont sains et essentiellement non affectés par cette

mutation. Toutefois, des données récentes ont remis en question cette croyance et ont suggéré qu'il existe un risque accru de maladie cliniquement apparente chez les porteurs hétérozygotes de mutations du gène CFTR et ce, surtout au niveau des tissus où le CFTR exerce une fonction importante tels les poumons et le pancréas. De ce fait, si, tel que nos résultats le suggèrent, le CFTR joue un rôle non négligeable dans l'os, la mutation d'un allèle exercerait un impact négatif modéré sur la santé osseuse, ce qui semble être le cas chez les souris *Cftr +/-*.

Approches expérimentales: La force d'un os dépend de plusieurs paramètres dont la macroarchitecture, la microarchitecture, la minéralisation osseuse, le niveau de remodelage osseux, l'accumulation de microlésions et les propriétés mécaniques du tissu osseux. Dans ce projet, nous n'avons pas caractérisé certains paramètres (i.e. accumulation de microlésions, composition de la matrice (collagène) et du minéral osseux, biomécanique), mais nous avons dressé un portrait autant macroscopique que microscopique nous permettant d'étudier l'étendue de la maladie osseuse chez les souris *Cftr -/-*. Les travaux effectués permettent de faire avancer les connaissances sur les facteurs pathogéniques et les défauts cellulaires à l'origine du phénotype osseux. De plus, nous avons uniquement travaillé avec des souris âgées entre 10 et 12 semaines ce qui représente l'âge de maturité squelettique dans un modèle murin. L'âge est donc un facteur très important dans l'étude des cellules osseuses puisque celui-ci pourrait avoir un impact sur leur phénotype. La culture cellulaire des Ob et des Oc étaient dérivées de la MO à l'aide de facteurs de différenciation très bien caractérisés dans la littérature actuelle. De plus, la culture des Ob a été faite à plusieurs temps tout au long de la maturation ce qui nous a permis d'étudier tous les stades de différenciation. À ce jour, ce genre d'observation n'a pas été faite dans un contexte de FK et cette étude a permis de confirmer un problème au niveau des phases intermédiaire et tardive de la différenciation ostéoblastique.

Chapitre 6. Perspectives futures et conclusion

Plusieurs études doivent être entreprises afin de cerner le rôle du CFTR dans la maladie osseuse associée à la FK. À la lumière des résultats obtenus, plusieurs éléments demeurent sans réponse et représentent de futures avenues à explorer. Bien que nous ayons démontré que les souris FK ne souffrent pas de malnutrition, d'autres raisons pourraient expliquer leur petite taille, dont leur métabolisme énergétique. Nous avons remarqué, de façon anecdotique, que ces souris ne sont pas très actives (locomotion diminuée) au sein de leur cage. De ce fait, il serait donc intéressant d'étudier leur locomotion et leur métabolisme à l'aide d'une chambre métabolique afin de vérifier si l'inactivité physique et/ou une altération de leur métabolisme énergétique pourraient être d'autres facteurs pathogéniques expliquant le phénotype osseux présent chez ces souris. De plus, puisque les souris FK souffrent de malabsorption lipidique, il serait important de vérifier si ces souris souffrent également d'une malabsorption de protéines qui pourrait avoir un impact sur le tissu osseux.

D'autre part, en collaboration avec l'école Polytechnique, des analyses biomécaniques sont déjà en cours au laboratoire afin de voir si les défauts observés au niveau de la microarchitecture osseuse se traduisent par une fragilité osseuse accentuée lorsqu'une force est appliquée sur l'os. Ce type d'expérience n'a jamais été réalisé dans un contexte de FK. Tel que mentionné dans la section 1.4.4.2, l'expression du CFTR au sein des cellules osseuses est encore controversée. Nous avons confirmé que les Ob expriment le CFTR et que celui-ci a une localisation non-classique. Dans l'optique de mieux comprendre l'effet de l'absence de celui-ci chez les Ob, il serait intéressant de localiser plus précisément le CFTR dans la cellule afin de voir s'il se concentre au sein d'organelles précises et d'investiguer plus en détail son rôle dans ces cellules (i.e. signalisation). Nous avons démontré que la différenciation ostéoblastique semble perturbée chez les souris FK de la même façon qu'en absence de l'enzyme *Dicer* dans l'article de *Gaur et al.* [123]. De plus, il a été démontré que la délétion de *Dicer* au sein des Ob a un impact sur l'hématopoïèse et sur la mobilisation des HSCs [139]. Puisque les patients FK démontrent un profil de miARN altéré au niveau d'autres organes, il serait intéressant de comparer le profil de miARN des Ob des souris FK vs. WT à différents temps de différenciation. Par ailleurs, puisque la différenciation ostéoblastique semble perturbée, il serait intéressant d'étudier les ostéocytes dans ce même modèle. On pourrait croire que si les

Ob sont altérés, le défaut sera également présent lorsqu'ils deviennent ostéocytes. Un défaut ostéoblastique peut perturber plusieurs phénomènes tels que l'hématopoïèse. Nous avons démontré que le nombre de leucocytes est affecté chez nos souris FK. Il serait donc intéressant de voir s'il s'agit d'un défaut dans le nombre de précurseurs, soit les CLPs et les CMPs, un problème de différenciation ou de rétention.

En conclusion, ce projet de maîtrise nous a permis de mieux comprendre l'implication du CFTR comme facteur étiologique dans la maladie osseuse associée à la FK. Les résultats de cette recherche nous permettent d'éliminer l'hypogonadisme et la malnutrition comme cause du phénotype osseux des souris *Cftr* *-/-*. En absence de ces facteurs étiologiques, l'absence du CFTR demeure une des causes principales de la maladie osseuse chez ces souris. Par contre, tel que mentionné précédemment, la malabsorption protéique reste à être investiguée. Nous avons également démontré que le CFTR n'est pas présent chez les Oc dérivés de la MO, contrairement aux Ob où son expression augmente avec la différenciation cellulaire suggérant que cette protéine joue un rôle chez l'Ob mature. Chez les souris *Cftr* *-/-*, l'absence de cette protéine n'a pas d'effet direct sur la différenciation ostéoclastique, mais a un impact négatif sur la différenciation ostéoblastique et sur ses fonctions (i.e minéralisation et activité ALP). De plus, l'absence du CFTR influence négativement la niche hématopoïétique de la MO en altérant le niveau des différentes populations de leucocytes au niveau intramédullaire.

En démontrant la présence d'un défaut ostéoblastique, il sera possible d'utiliser ces résultats comme base à l'investigation d'agents pharmacologiques connus permettant de cibler spécifiquement cette population cellulaire. Ces agents sont étudiés dans l'ostéoporose post-ménopausique, mais n'ont jamais été étudiés en FK. De plus, la confirmation que le CFTR est bel et bien un facteur étiologique permettra d'explorer si les nouvelles molécules correctrices du CFTR, utilisées comme agents thérapeutiques en FK, permettront également de corriger le phénotype osseux *in vivo*.

Bibliographie

1. Toppets V., P.V., De Behr V., Antoine N., Dessy C., Gabriel A., *Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux*. Ann. Méd. Vét., 2004. **148**(1): p. 1-13.
2. Guay, M., *Anatomie fonctionnelle de l'appareil locomoteur: os, articulations, muscles*. 2005: Presses de l'Université de Montréal.
3. Lüllmann-Rauch, R., *Histologie*. 2008, De Boeck Supérieur. p. 704 pages.
4. Bernaudin, J.-F., *Atlas en couleur d'histologie*, ed. É. Pradel. 1997, Paris: Masson-Williams & Wilkins France. 397.
5. Marieb, E., et al., *Anatomie et physiologie humaines: Livre + eText + plateforme numérique MonLab - Licence étudiant 60 mois*. 2014: ERPI.
6. Collectif, Q.I., *La structure des os*, in *Les Guides de la connaissance - Le Corps Humain - Comprendre notre organisme et son fonctionnement* Q. Amérique, Editor. 2002. p. 128 page.
7. Seeman, E. and P.D. Delmas, *Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility*. N Engl J Med, 2006. **354**(21): p. 2250-61.
8. Nguyen Hung Sy, B.R., *La composition des os*, in *Manuel d'anatomie et de physiologie* Lamarre, Editor. 2008, Wolters Kluwer France: France. p. 162-165.
9. Hennen, G., *Endocrinologie*. 2001: De Boeck Supérieur.
10. Kierszenbaum, A., *Tissu conjonctif*, in *Histologie et biologie cellulaire: Une introduction à l'anatomie pathologique*. 2006, De Boeck Supérieur. p. 95-129.
11. Nataf, S. *Histologie*. 2015-08-08]; Le tissu osseux].
12. Titorencu, I., et al., *Osteoblast ontogeny and implications for bone pathology: an overview*. Cell Tissue Res, 2014. **355**(1): p. 23-33.
13. Marie, P., *Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste*. Med Sci (Paris), 2001. **17**(12): p. 1252-1259.
14. Capulli, M., R. Paone, and N. Rucci, *Osteoblast and osteocyte: games without frontiers*. Arch Biochem Biophys, 2014. **561**: p. 3-12.
15. Manolagas, S.C., *Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis*. Endocr Rev, 2000. **21**(2): p. 115-37.
16. Chen, G., C. Deng, and Y.P. Li, *TGF-beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation*. Int J Biol Sci, 2012. **8**(2): p. 272-88.
17. Zhang, C., *Transcriptional regulation of bone formation by the osteoblast-specific transcription factor *Osx**. J Orthop Surg Res, 2010. **5**: p. 37.
18. Neve, A., A. Corrado, and F.P. Cantatore, *Osteoblast physiology in normal and pathological conditions*. Cell Tissue Res, 2011. **343**(2): p. 289-302.
19. Hadjidakis, D.J. and Androulakis, II, *Bone remodeling*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1092**: p. 385-96.
20. Plotkin, L.I., *Apoptotic osteocytes and the control of targeted bone resorption*. Curr Osteoporos Rep, 2014. **12**(1): p. 121-6.
21. Nguyen, S.H., A.C. Allin-Pfister, and R. Bourouina, *Manuel d'anatomie et de physiologie*. 2008: Ed. Lamarre.

22. Baron, R., *L'ostéoclaste et les mécanismes moléculaires de la résorption osseuse*. Med Sci (Paris), 2001. **17**(12): p. 1260-1269.
23. Goltzman, D., *Discoveries, drugs and skeletal disorders*. Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(10): p. 784-96.
24. Raisz, L.G., *Physiology and pathophysiology of bone remodeling*. Clin Chem, 1999. **45**(8 Pt 2): p. 1353-8.
25. Oxygem. *L'ostéoporose*. 1998-2914; Available from: http://www.passeportsante.net/fr/Maux/Problemes/Fiche.aspx?doc=osteoporose_pm.
26. Brooker, C., I. Langlois-Wils, and É. Lepresle, *Le corps humain: Étude, structure et fonction*. 2000: De Boeck Supérieur.
27. Kierszenbaum, A.L., P. Validire-Charpy, and P. Validire, *Histologie et biologie cellulaire: Une introduction à l'anatomie pathologique*. 2006: De Boeck Supérieur.
28. Ganong, W. and M. Jobin, *Physiologie médicale*. 2005: De Boeck Supérieur.
29. FMC and F.E.A. Najoua Ghani, Taoufik Harzy, *Le remodelage osseux et ses implications thérapeutiques dans l'ostéoporose : mise au point* Revue Marocaine de Rhumatologie, 2012. **21**: p. 10-15.
30. Moussard, C. and C. Mouglin, *Biologie moléculaire. Biochimie des communications cellulaires*. 2005: De Boeck Supérieur.
31. *Remodelage osseux* 2014 [cited 2015 12-05]; Cycle remodelage osseux]. Available from: https://lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Remodelage+Osseux&lang=4.
32. Kini Usha, N.B.N., *Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism*, in *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging*. 2012, Springer berlin Heidelberg. p. 29-57.
33. van de Peppel, J. and J.P. van Leeuwen, *Vitamin D and gene networks in human osteoblasts*. Front Physiol, 2014. **5**: p. 137.
34. Eisman, J.A. and R. Bouillon, *Vitamin D: direct effects of vitamin D metabolites on bone: lessons from genetically modified mice*. Bonekey Rep, 2014. **3**: p. 499.
35. Walsh, M.C. and Y. Choi, *Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 511.
36. Schett, G., *Effects of inflammatory and anti-inflammatory cytokines on the bone*. Eur J Clin Invest, 2011. **41**(12): p. 1361-6.
37. Hardy, R. and M.S. Cooper, *Bone loss in inflammatory disorders*. J Endocrinol, 2009. **201**(3): p. 309-20.
38. Cortet, B. and X. Marchandise, *Microarchitecture et résistance mécanique osseuse*. Revue du Rhumatisme, 2001. **68**(7): p. 584-594.
39. Coujard, R. and J. Poirier, *Précis d'histologie humaine*. 1980: Masson.
40. Bommas-Ebert, U., et al., *Cours d'anatomie*. 2008: De Boeck Supérieur.
41. Stevens, A. and J. Lowe, *Histologie humaine*. 1997: De Boeck Supérieur.
42. Tavian, M. and B. Peault, *Embryonic development of the human hematopoietic system*. Int J Dev Biol, 2005. **49**(2-3): p. 243-50.
43. Olobot. *Qu'est-ce que la moelle osseuse?* 2014 [2015-06-15]; Available from: <http://repli.net/l'article/greffe-de-moelle-osseuse-chez-les-enfants>.
44. Kindt, T.J., et al., *Kuby Immunology*. 2007: W. H. Freeman.
45. Janeway, C.A., et al., *Immunobiologie*. 2009: De Boeck Supérieur.
46. Schofield, R., *The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell*. Blood Cells, 1978. **4**(1-2): p. 7-25.

47. Sébahoun, G., *Hématologie clinique et biologique*. 2005: Arnette.
48. Georgia, B.M. and R. Xavier, *Culture de cellules animales (3^e éd.)*. 2014.
49. Kopp, H.G., et al., *The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization*. *Physiology (Bethesda)*, 2005. **20**: p. 349-56.
50. Taichman, R.S. and S.G. Emerson, *Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor*. *J Exp Med*, 1994. **179**(5): p. 1677-82.
51. Kerem, B., et al., *Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis*. *Science*, 1989. **245**(4922): p. 1073-80.
52. Raymond, G., *Physiologie Animale*, in *Physiologie Animale* D.B. Supérieur, Editor. 2006. p. 73-75.
53. Bush, A., *Cystic Fibrosis in the 21st Century*. 2006: Karger.
54. CFTR.info. *CFTR structure and regulation*. 2015; Available from: <http://www.cftr.info/about-cf/role-of-ctfr-in-cf/genetics-and-cell-biology-of-cftr/cftr-structure-and-regulation/>.
55. Kunzelmann, K., *CFTR: interacting with everything?* *News Physiol Sci*, 2001. **16**: p. 167-70.
56. Ballard, S.T., et al., *CFTR involvement in chloride, bicarbonate, and liquid secretion by airway submucosal glands*. *Am J Physiol*, 1999. **277**(4 Pt 1): p. L694-9.
57. Sheppard, D.N. and M.J. Welsh, *Structure and function of the CFTR chloride channel*. *Physiol Rev*, 1999. **79**(1 Suppl): p. S23-45.
58. Rowe, S.M., S. Miller, and E.J. Sorscher, *Cystic fibrosis*. *N Engl J Med*, 2005. **352**(19): p. 1992-2001.
59. Li, C. and A.P. Naren, *Macromolecular complexes of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and its interacting partners*. *Pharmacol Ther*, 2005. **108**(2): p. 208-23.
60. Kunzelmann, K. and A. Mehta, *CFTR: a hub for kinases and crosstalk of cAMP and Ca²⁺*. *FEBS J*, 2013. **280**(18): p. 4417-29.
61. Foundation, C.F., *Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry*, A.d. report, Editor. 2013.
62. Edelman, A. and J.M. Sallenave, *Cystic fibrosis, a multi-systemic mucosal disease: 25 years after the discovery of CFTR*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014. **52**: p. 2-4.
63. Sweezey, N.B. and F. Ratjen, *The cystic fibrosis gender gap: potential roles of estrogen*. *Pediatr Pulmonol*, 2014. **49**(4): p. 309-17.
64. Rommens, D.J.M. *CFMDB Statistics Cystic Fibrosis Mutation Database*]. Available from: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html>.
65. Griesenbach, U. and E.W. Alton, *Recent advances in understanding and managing cystic fibrosis transmembrane conductance regulator dysfunction*. *F1000Prime Rep*, 2015. **7**: p. 64.
66. S. Karger AG, K., *Cystic Fibrosis: A State-of-the-Art Series*. 2001: Karger Medical and Scientific Publishers. 72.
67. Rowntree, R.K. and A. Harris, *The phenotypic consequences of CFTR mutations*. *Ann Hum Genet*, 2003. **67**(Pt 5): p. 471-85.
68. Jacquot, J., et al., *Airway epithelial cell inflammatory signalling in cystic fibrosis*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008. **40**(9): p. 1703-15.

69. Lyczak, J.B., C.L. Cannon, and G.B. Pier, *Lung infections associated with cystic fibrosis*. Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(2): p. 194-222.
70. Kelly, T. and J. Buxbaum, *Gastrointestinal Manifestations of Cystic Fibrosis*. Dig Dis Sci, 2015.
71. Ooi, C.Y. and P.R. Durie, *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in pancreatitis*. J Cyst Fibros, 2012. **11**(5): p. 355-62.
72. Kobelska-Dubiel, N., B. Klinecicz, and W. Cichy, *Liver disease in cystic fibrosis*. Prz Gastroenterol, 2014. **9**(3): p. 136-41.
73. O'Shea, D. and J. O'Connell, *Cystic fibrosis related diabetes*. Curr Diab Rep, 2014. **14**(8): p. 511.
74. Quon, B.S. and M.L. Aitken, *Cystic fibrosis: what to expect now in the early adult years*. Paediatr Respir Rev, 2012. **13**(4): p. 206-14.
75. Paccou, J., et al., *The prevalence of osteoporosis, osteopenia, and fractures among adults with cystic fibrosis: a systematic literature review with meta-analysis*. Calcif Tissue Int, 2010. **86**(1): p. 1-7.
76. Dif, F., et al., *Severe osteopenia in CFTR-null mice*. Bone, 2004. **35**(3): p. 595-603.
77. Aris, R.M., et al., *Increased rate of fractures and severe kyphosis: sequelae of living into adulthood with cystic fibrosis*. Ann Intern Med, 1998. **128**(3): p. 186-93.
78. Elkin, S.L., et al., *Histomorphometric analysis of bone biopsies from the iliac crest of adults with cystic fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **166**(11): p. 1470-4.
79. Ambroszkiewicz, J., et al., *Bone turnover markers, osteoprotegerin and RANKL cytokines in children with cystic fibrosis*. Adv Med Sci, 2013. **58**(2): p. 338-43.
80. Sermet-Gaudelus, I., et al., *Low bone mineral density in young children with cystic fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **175**(9): p. 951-7.
81. Greer, R.M., et al., *Abnormalities of the PTH-vitamin D axis and bone turnover markers in children, adolescents and adults with cystic fibrosis: comparison with healthy controls*. Osteoporos Int, 2003. **14**(5): p. 404-11.
82. Cobanoglu, N., et al., *Relation of bone mineral density with clinical and laboratory parameters in pre-pubertal children with cystic fibrosis*. Pediatr Pulmonol, 2009. **44**(7): p. 706-12.
83. Stalvey, M.S. and G.A. Clines, *Cystic fibrosis-related bone disease: insights into a growing problem*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2013. **20**(6): p. 547-52.
84. Shead, E.F., et al., *Osteoclastogenesis during infective exacerbations in patients with cystic fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. **174**(3): p. 306-11.
85. Ionescu, A.A., et al., *Bone density, body composition, and inflammatory status in cystic fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **162**(3 Pt 1): p. 789-94.
86. Aris, R.M., et al., *Adverse alterations in bone metabolism are associated with lung infection in adults with cystic fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **162**(5): p. 1674-8.
87. Haston, C.K., et al., *Persistent osteopenia in adult cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-deficient mice*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. **177**(3): p. 309-15.
88. Paradis, J., M. Wilke, and C.K. Haston, *Osteopenia in Cfr-deltaF508 mice*. J Cyst Fibros, 2010. **9**(4): p. 239-45.

89. Stalvey, M.S., et al., *Osteoblast CFTR inactivation reduces differentiation and osteoprotegerin expression in a mouse model of cystic fibrosis-related bone disease*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e80098.
90. Le Henaff, C., et al., *The F508del mutation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene impacts bone formation*. Am J Pathol, 2012. **180**(5): p. 2068-75.
91. Shead, E.F., et al., *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) is expressed in human bone*. Thorax, 2007. **62**(7): p. 650-1.
92. Pashuck, T.D., et al., *Murine model for cystic fibrosis bone disease demonstrates osteopenia and sex-related differences in bone formation*. Pediatr Res, 2009. **65**(3): p. 311-6.
93. Aris, R.M., et al., *Guide to bone health and disease in cystic fibrosis*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(3): p. 1888-96.
94. Boyle, M.P., *Update on maintaining bone health in cystic fibrosis*. Curr Opin Pulm Med, 2006. **12**(6): p. 453-8.
95. *Cystic fibrosis and bone health* March 2013; Available from: <http://www.cysticfibrosis.org.uk/publications>.
96. Conwell, L.S. and A.B. Chang, *Bisphosphonates for osteoporosis in people with cystic fibrosis*. Cochrane Database Syst Rev, 2014. **3**: p. CD002010.
97. Siwamogsatham, O., K. Stephens, and V. Tangpricha, *Evaluation of teriparatide for treatment of osteoporosis in four patients with cystic fibrosis: a case series*. Case Rep Endocrinol, 2014. **2014**: p. 893589.
98. Wang, H., et al., *Hierarchical organization and regulation of the hematopoietic stem cell osteoblastic niche*. Crit Rev Oncol Hematol, 2013. **85**(1): p. 1-8.
99. Yin, T. and L. Li, *The stem cell niches in bone*. J Clin Invest, 2006. **116**(5): p. 1195-201.
100. Gregory, C.A., et al., *An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction*. Anal Biochem, 2004. **329**(1): p. 77-84.
101. Mischler, E.H., et al., *Demineralization in cystic fibrosis detected by direct photon absorptiometry*. Am J Dis Child, 1979. **133**(6): p. 632-5.
102. Rosenberg, L.A., et al., *Mouse as a model of growth retardation in cystic fibrosis*. Pediatr Res, 2006. **59**(2): p. 191-5.
103. Bederman, I., et al., *Altered de novo lipogenesis contributes to low adipose stores in cystic fibrosis mice*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2012. **303**(4): p. G507-18.
104. Kaji, H., *Interaction between Muscle and Bone*. J Bone Metab, 2014. **21**(1): p. 29-40.
105. Marcus, R., et al., *Osteoporosis: Two-Volume Set*. 2013: Elsevier Science.
106. Bijvelds, M.J., et al., *Fat absorption in cystic fibrosis mice is impeded by defective lipolysis and post-lipolytic events*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005. **288**(4): p. G646-53.
107. Kent, G., et al., *Phenotypic abnormalities in long-term surviving cystic fibrosis mice*. Pediatr Res, 1996. **40**(2): p. 233-41.
108. Grubb, B.R. and R.C. Boucher, *Pathophysiology of gene-targeted mouse models for cystic fibrosis*. Physiol Rev, 1999. **79**(1 Suppl): p. S193-214.

109. Kaur, S., et al., *Acidic duodenal pH alters gene expression in the cystic fibrosis mouse pancreas*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **287**(2): p. G480-90.
110. Haworth, C.S., et al., *Bone histomorphometry in adult patients with cystic fibrosis*. Chest, 2000. **118**(2): p. 434-9.
111. Donovan, D.S., Jr., et al., *Bone mass and vitamin D deficiency in adults with advanced cystic fibrosis lung disease*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(6 Pt 1): p. 1892-9.
112. Gawenis, L.R., et al., *Mineral content of calcified tissues in cystic fibrosis mice*. Biol Trace Elem Res, 2001. **83**(1): p. 69-81.
113. Gosalia, N. and A. Harris, *Chromatin Dynamics in the Regulation of CFTR Expression*. Genes (Basel), 2015. **6**(3): p. 543-58.
114. Yoshimura, K., et al., *Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in cells of non-epithelial origin*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(19): p. 5417-23.
115. Greene, C.M., *MicroRNA Expression in Cystic Fibrosis Airway Epithelium*. Biomolecules, 2013. **3**(1): p. 157-67.
116. Painter, R.G., et al., *CFTR Expression in human neutrophils and the phagolysosomal chlorination defect in cystic fibrosis*. Biochemistry, 2006. **45**(34): p. 10260-9.
117. Strong, T.V., K. Boehm, and F.S. Collins, *Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA in the human gastrointestinal tract by in situ hybridization*. J Clin Invest, 1994. **93**(1): p. 347-54.
118. Sood, R., et al., *Regulation of CFTR expression and function during differentiation of intestinal epithelial cells*. EMBO J, 1992. **11**(7): p. 2487-94.
119. Liu, L., et al., *Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 1 (NHERF1) directly regulates osteogenesis*. J Biol Chem, 2012. **287**(52): p. 43312-21.
120. Wang, B., et al., *NHERF1 regulation of PTH-dependent bimodal Pi transport in osteoblasts*. Bone, 2013. **52**(1): p. 268-77.
121. Clarke, B., *Normal bone anatomy and physiology*. Clin J Am Soc Nephrol, 2008. **3 Suppl 3**: p. S131-9.
122. Le Henaff, C., et al., *Increased NF-kappaB Activity and Decreased Wnt/beta-Catenin Signaling Mediate Reduced Osteoblast Differentiation and Function in DeltaF508 Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Mice*. J Biol Chem, 2015. **290**(29): p. 18009-17.
123. Gaur, T., et al., *Dicer inactivation in osteoprogenitor cells compromises fetal survival and bone formation, while excision in differentiated osteoblasts increases bone mass in the adult mouse*. Dev Biol, 2010. **340**(1): p. 10-21.
124. Fang, S., et al., *MicroRNAs regulate bone development and regeneration*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(4): p. 8227-53.
125. Gillen, A.E., et al., *MicroRNA regulation of expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene*. Biochem J, 2011. **438**(1): p. 25-32.
126. Adler, B.J., K. Kaushansky, and C.T. Rubin, *Obesity-driven disruption of haematopoiesis and the bone marrow niche*. Nat Rev Endocrinol, 2014. **10**(12): p. 737-48.
127. Bowers, M., et al., *Osteoblast ablation reduces normal long-term hematopoietic stem cell self-renewal but accelerates leukemia development*. Blood, 2015. **125**(17): p. 2678-88.

128. Visnjic, D., et al., *Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency*. *Blood*, 2004. **103**(9): p. 3258-64.
129. Calvi, L.M., et al., *Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche*. *Nature*, 2003. **425**(6960): p. 841-6.
130. Yu, V.W., et al., *Specific bone cells produce DLL4 to generate thymus-seeding progenitors from bone marrow*. *J Exp Med*, 2015. **212**(5): p. 759-74.
131. Fogg, D.K., et al., *A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells*. *Science*, 2006. **311**(5757): p. 83-7.
132. Golan, K., O. Kollet, and T. Lapidot, *Dynamic Cross Talk between SIP and CXCL12 Regulates Hematopoietic Stem Cells Migration, Development and Bone Remodeling*. Pharmaceuticals (Basel), 2013. **6**(9): p. 1145-69.
133. Alexander, K.A., et al., *Osteal macrophages promote in vivo intramembranous bone healing in a mouse tibial injury model*. *J Bone Miner Res*, 2011. **26**(7): p. 1517-32.
134. Winkler, I.G., et al., *Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs*. *Blood*, 2010. **116**(23): p. 4815-28.
135. Vi, L., et al., *Macrophages promote osteoblastic differentiation in-vivo: implications in fracture repair and bone homeostasis*. *J Bone Miner Res*, 2015. **30**(6): p. 1090-102.
136. Chang, J., et al., *Activated hepatic stellate cells mediate the differentiation of macrophages*. *Hepato Res*, 2013. **43**(6): p. 658-69.
137. Johns, J.L. and M.M. Christopher, *Extramedullary hematopoiesis: a new look at the underlying stem cell niche, theories of development, and occurrence in animals*. *Vet Pathol*, 2012. **49**(3): p. 508-23.
138. Badolato, R., *Leukocyte circulation: one-way or round-trip? Lessons from primary immunodeficiency patients*. *J Leukoc Biol*, 2004. **76**(1): p. 1-6.
139. Mercier, F.E., C. Ragu, and D.T. Scadden, *The bone marrow at the crossroads of blood and immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2012. **12**(1): p. 49-60.

