

Université de Montréal

*Identification par clonage positionnel
du gène grey-lethal (gl) chez la souris*

par

Nader Chalhoub

Programmes de biologie moléculaire
Faculté des études supérieures

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en Biologie Moléculaire

Juillet, 2003

©, Nader Chalhoub, 2003



QH

506

U54

2004

v.001

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :
Identification par clonage positionnel
du gène grey-lethal (gl) chez la souris

présentée par :
Nader Chalhoub

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

.....
Dr. Daniel Sinnett

président-rapporteur

.....
Dr. Jean Vacher

directeur de recherche

.....
Dr. Marie Trudel

membre du jury

.....
Dr. Roland Baron

examineur externe

.....
Dr. Daniel Sinnett

représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ

L'ostéopétrose est une maladie génétique autosomale causée par l'absence ou la perte d'activité des ostéoclastes, cellules d'origine hématopoïétique et spécialisées dans la résorption du tissu osseux. En particulier, l'ostéopétrose récessive infantile maligne qui fait l'objet de cette thèse, représente la forme la plus rare et sévère de la maladie. La rareté de la maladie nécessite le recours aux modèles animaux, en particulier la souris, pour l'identification des gènes responsables. Deux gènes, *TCIRG1* et *CLCN7*, ont été associés directement à la maladie chez 50% des patients reportés dans la littérature, suggérant ainsi l'implication d'autres gènes dans ce désordre squelettique. La souris grey-lethal (*gl*) est un modèle établi de l'ostéopétrose récessive dont le phénotype est très proche de celui observé dans la maladie infantile humaine: accumulation anormale du tissu osseux avec un faible développement de la cavité médullaire, mort précoce et complémentation fonctionnelle après transfert de moelle osseuse. De plus, ce modèle de souris présente un phénotype unique de couleur grise du pelage.

Cette thèse porte principalement sur l'identification et la caractérisation du gène *gl* chez la souris et sur l'isolement de son homologue humain *GL*. Par clonage positionnel, le gène *gl* cartographié sur le chromosome 10 de la souris, a été localisé finement dans un intervalle génétique de ~2 cM, et physiquement sur un contig de ~8.5 Mb de chromosomes artificiels de levure (YAC), suivi d'un contig de ~500 kb de chromosomes artificiels de bactérie (BAC). L'identification fonctionnelle du gène *gl* a été obtenue par

complémentation fonctionnelle *in vivo* dans des souris BAC transgéniques. L'ADNc pleine longueur a été isolé et correspond à un ARN messenger unique de ~3 Kb exprimé dans le cerveau, le rein, la rate, les ostéoclastes (OCL) et les mélanocytes générés en culture. De plus, des analyses complémentaires par hybridation *in situ* ont confirmé l'expression du gène *gl* *in vivo* dans le système hématopoïétique, le squelette et la peau, plus particulièrement dans les ostéoclastes et les mélanocytes natifs. Des analyses de la structure génomique du locus *gl* ont permis d'identifier la mutation *gl* qui consiste en une délétion de la région promotrice, résultant en une absence totale du messenger. La protéine Gl est composée de 338 acides aminés, comprend un domaine transmembranaire potentiel, et a été localisée dans le cytoplasme. L'identification du gène *gl* chez la souris a permis d'isoler son homologue humain localisant en 6q21, et de caractériser la première mutation du gène *GL* associée avec le développement de la forme la plus sévère de l'ostéopétrose récessive infantile humaine. Grâce à l'essai mis au point, des premiers tests diagnostiques, prénatal et génotypage, ont pu être accomplis sur la même famille.

L'ensemble de mes études permettra de mieux comprendre la fonction de l'ostéoclaste et potentiellement de moduler spécifiquement son activité afin de développer des approches thérapeutiques pour le traitement de l'ostéoporose et de l'ostéopétrose.

Mots clés: ostéopétrose, ostéoclaste, mélanocyte, OCL, grey-lethal, YAC, BAC, contig, chromosome 10, 6q21.

SUMMARY

Osteopetrosis is an autosomal genetic disease caused by an absence, or defective function, of osteoclasts which are cells from hematopoietic origin and specialized in bone resorption. In particular, the recessive infantile malignant osteopetrosis which is the subject of this thesis, is the most rare and severe form of the disease. The rareness of the disease renders essential the use of animal models, in particular the mouse, to identify involved genes. Two genes, *TCIRG1* and *CLCN7*, have been directly associated with the disease in 50% of patients reported in the literature, therefore suggesting that other genes are involved in this skeletal disorder. Grey-lethal (*gl*) mouse is an established and relevant model for recessive osteopetrosis, displaying phenotypes closely related to those observed in the human infantile disease: abnormal accumulation of bone tissue with an underdevelopment of the bone marrow space, early death, and functional rescue by bone marrow transplantation. Furthermore, this mouse model displays a unique grey-coat color phenotype.

This thesis discusses the identification and characterization of the mouse *gl* gene, and the isolation of its human homolog *GL*. Using positional cloning, the *gl* gene mapped to mouse chromosome 10, was precisely localized within a ~2 cM genetic interval, physically mapped to a ~8.5 Mb yeast artificial chromosome (YAC) contig, and pinpointed to a ~500 kb physical interval within a bacterial artificial chromosome (BAC) contig. Functional identification of the *gl* gene was obtained by *in vivo* functional

complementation in BAC transgenic mice. Full-length cDNA was isolated and corresponds to a unique ~3 kb mRNA expressed primarily in brain, kidney, spleen, cultured osteoclasts (OCL) and melanocytes. Furthermore, complementary *in vivo* analysis by *in situ* hybridization confirmed the expression of the *gl* gene in the hematopoietic system, the skeleton, and the skin, particularly in native osteoclasts and melanocytes. Genomic structure analysis of the *gl* locus identified the *gl* mutation as a deletion of the promoter region, resulting in a total absence of the transcript. The Gl protein is composed of 338 amino acids, harbors a potential transmembrane domain, and was localized to the cytoplasm. Identification of the mouse *gl* gene led to the isolation of its human homolog *GL* mapping to 6q21, and to the characterization of the first *GL* mutation associated with the development of the most severe form of human infantile recessive osteopetrosis. Owing to the novel mutation-specific detection assay, a first prenatal and screening diagnostic tests were accomplished on this family. Alltogether, the data presented herein will lead to a better understanding of the osteoclast function, and potentially to modulate specifically its activity in order to develop therapeutic approaches toward the treatment of osteoporosis and osteopetrosis.

Key words: osteopetrosis, osteoclast, melanocyte, OCL, grey-lethal, YAC, BAC, contig, chromosome 10, 6q21.

TABLE DES MATIÈRES

TITRE DE LA THÈSE.....	i
IDENTIFICATION DU JURY	ii
RÉSUMÉ.....	iii
SUMMARY	v
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xiv
DÉDICACE	xvi
REMERCIEMENTS	xvii

CHAPITRE I

INTRODUCTION	1
1)Cellules osseuses et remodelage osseux	2
1.1)L'ostéoblaste et la formation osseuse	6
1.1.1)Origine de l'ostéoblaste.....	6
1.1.2)Fonctions de l'ostéoblaste	8
1.1.3)Différenciation et contrôle de l'ostéoblaste.....	10
1.2)L'ostéoclaste et la résorption osseuse	14
1.2.1)Origine et différenciation de l'ostéoclaste.....	15
1.2.2)Mécanisme de la résorption osseuse	21
1.2.2.1)Attachement et migration de l'ostéoclaste	23
1.2.2.2)Dissolution et dégradation de la matrice osseuse	27
1.2.2.3)Apoptose et contrôle de la résorption osseuse	31
2)Désordres squelettiques et modèles animaux	32
2.1)Désordres squelettiques	32
2.2)Modèles animaux de l'ostéoporose	35
2.3)Modèles animaux de l'ostéopétrose	40
2.3.1)Mutants spontanés chez la souris	40

2.3.2)Mutants induits chez la souris.....	44
3)L'ostéopétrose humaine.....	49
3.1)L'ostéopétrose récessive maligne.....	49
3.2)L'ostéopétrose récessive intermédiaire.....	51
3.3)L'ostéopétrose dominante bénigne.....	51
4)La souris grey-lethal.....	52
4.1)Origine et maintien de la mutation <i>gl</i>	52
4.2)Phénotypes de la souris <i>gl</i>	52
4.2.1)Phénotype squelettique.....	53
4.2.2)Phénotype de couleur du pelage.....	55
4.3)Caractérisation cellulaire.....	57
4.3.1)Ostéoclastes.....	57
4.3.2)Poils et cellules pigmentaires.....	60
4.4)Localisation génétique de la mutation grey-lethal.....	61
4.4.1)Croisements de souris.....	61
4.4.2)Clonage positionnel.....	63

CHAPITRE II

ARTICLE 1.....	66
SOMMAIRE.....	67
TITRE.....	69
ABSTRACT.....	70
INTRODUCTION.....	71
MATERIAL AND METHODS.....	74
RESULTS AND DISCUSSION.....	77
ACNOWLEDGMENTS.....	87
REFERENCES.....	88

CHAPITRE III

ARTICLE 2.....	91
----------------	----

SOMMAIRE	92
TITRE	95
ABSTRACT	96
INTRODUCTION	97
RESULTS	101
DISCUSSION	116
METHODS	121
ACKNOWLEDGEMENTS	127
REFERENCES	128

CHAPITRE IV

DISCUSSION	132
1) Raffinement de la carte génétique	133
2) Carte physique et transcriptionnelle de clones contigus YACs	135
3) Carte physique et transcriptionnelle de clones contigus BACs	137
4) Localisation fine du gène <i>gl</i> par complémentation fonctionnelle dans des souris BAC transgéniques	138
5) Identification et caractérisation du gène <i>gl</i>	139
5.1) Structure génomique du gène <i>gl</i>	141
5.2) La mutation <i>gl</i>	141
6) Profil d'expression au cours du développement et au stade adulte ..	143
7) Structure et localisation sub-cellulaire de la protéine Gl	145
8) Conservation de la protéine Gl au cours de l'évolution	147
9) Le gène <i>GL</i> humain et l'ostéopétrose autosomale récessive infantile maligne	148
10) Fonction spéculative de la protéine Gl	154
11) Ostéopétrose chez la souris vs ostéopétrose humaine	157
CONCLUSION	159
BIBLIOGRAPHIE	161

APPENDICE I	179-180
APPENDICE II	181
APPENDICE III	182-185
APPENDICE IV	186
APPENDICE V	187-189

LISTE DES TABLEAUX**CHAPITRE II****ARTICLE 1**

Table 1: Gene, EST and STS markers developed in this study	80
---	-----------

APPENDICE I

Tableau 1: Caractérisation des recombinants de souris avec les marqueurs microsatellites et les nouveaux marqueurs générés à partir des extrémités des inserts des clones de YAC.....	179
--	------------

Tableau 2: Caractérisation des recombinants de souris avec les nouveaux marqueurs générés à partir des extrémités des inserts des clones de YAC et de BAC	180
--	------------

APPENDICE II

Tableau 1: Organisation génomique du gène <i>gl</i> de souris.....	181
---	------------

Tableau 2: Organisation génomique du gène <i>GL</i> humain.....	181
--	------------

APPENDICE V

Tableau 1: Séquences des oligonucléotides utilisés pour la recherche de mutations dans le gène <i>GL</i> humain, et conditions des réactions de PCR.....	187
---	------------

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Figure 1: Cycle du remodelage osseux	5
Figure 2: Différenciation des ostéoblastes à partir de cellules souches mésenchymateuses pluripotentes	7
Figure 3: Principaux marqueurs exprimés au cours de la différenciation des ostéoblastes	11
Figure 4: Principaux facteurs contrôlant l'ostéoblaste au cours de l'ostéogénèse	12
Figure 5: Voie de différenciation et d'activation des ostéoclastes	17
Figure 6: Bipolarité morphologique et fonctionnelle de l'ostéoclaste	22
Figure 7: Voies possibles de signalisation intracellulaires régulant l'activité de l'ostéoclaste	26
Figure 8: Processus d'acidification de l'ostéoclaste	30
Figure 9: Phénotypes de la souris grey-lethal (<i>gl</i>)	54
Figure 10: La couleur du poil chez la souris	55
Figure 11: Caractérisation cellulaire des ostéoclastes <i>gl</i>	59
Figure 12: Cartes génétiques incluant le locus <i>gl</i>	62
Figure 13: Stratégies d'identification de gène	64

CHAPITRE II

ARTICLE 1

Figure 1: Gene, EST, and STS content mapping of 103 overlapping YACs	79
Figure 2: Assignment and ordering of transcription units within the YACs contig interval	82
Figure 3: Physical and transcriptional map spanning the <i>gl</i> locus	84

CHAPITRE III

ARTICLE 2

Figure 1: Isolation of the mouse <i>gl</i> gene.....	102
Figure 2: Molecular characterization of the <i>gl</i> gene and mutation	105
Figure 3: <i>gl</i> expression pattern	108
Figure 4: Expression and immunolocalization of the Gl protein.....	111
Figure 5: Alignment of the predicted amino acid sequences of mouse and human Gl proteins (using ClustalW).....	112
Figure 6: DNA and RNA analysis of a patient with infantile malignant osteopetrosis	114

APPENDICE III

Figure 1: Profil d'expression de <i>gl</i> dans le tissu osseux.....	182
Figure 2: Profil d'expression de <i>gl</i> dans la peau	183
Figure 3: Profil d'expression de <i>gl</i> dans le cerveau adulte.....	184
Figure 4: Profil d'expression de <i>gl</i> dans l'intestin	185

APPENDICE IV

Figure 1: Alignement de la séquence protéique de Gl chez différentes espèces de vertébrés	186
---	-----

APPENDICE V

Figure 1: Essai d'épissage <i>in vitro</i>	188
Figure 2: Analyse moléculaire du gène <i>GL</i> dans une famille atteinte d'ostéopétrose autosomale récessive maligne	189

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ARO: autosomal recessive osteopetrosis

BAC: bacterial artificial chromosome

BLAST: basic local alignment search tool

bp: base pair

pb: paire de base

cDNA: complementary DNA

ADNc: ADN complémentaire

Chr: chromosome

cM: centimorgan

°C: degree celsius/degré celsius

DNA: deoxyribonucleic acid

ADN: acide désoxyribonucléique

dNTP: deoxyribonucleoside triphosphate

E: embryonic day

EST: expressed sequence tag

g/: grey-lethal

h: hour/heure

kb: kilobase

kD: kilodalton

LINE: long interspersed element

Mb: megabase

min: minute

ml: milliliter

μl: microliter

mM: millimolar

μM: micromolar

μm: micrometer

mRNA: messenger RNA

ARNm: ARN messenger

Mit: Massachusetts institute of technology

ng: nanogram

NCBI: national center for biotechnology information

PCR: polymerase chain reaction

OCL: osteoclast like cell

P: postnatal day

PAC: P1-derived artificial chromosome

PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis

RNA: ribonucleic acid

ARN: acide ribonucléique

RT-PCR: reverse transcriptase-PCR

s: second/seconde

SDS: sodium dodecylsulfate

SSLP: simple sequence length polymorphism

STS: sequence-tagged site

TBE: tris borate EDTA

U: unit

UTR: untranslated region

YAC: yeast artificial chromosome

DÉDICACE

À mes parents...

REMERCIEMENTS

Je remercie mon directeur de m'avoir accueilli et donné la chance d'effectuer mes travaux de doctorat dans son laboratoire, et pour le support financier tout le long de mes études.

Merci aux membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ma thèse, et d'avoir consacré un temps précieux pour la correction de celle-ci.

Je tiens aussi à remercier mes parents pour leur support moral et leur amour.

CHAPITRE I
INTRODUCTION

1) Cellules osseuses et remodelage osseux

Le squelette est constitué de 90 % d'os cortical qui forme la diaphyse des os longs, par exemple les os des membres, et qui entoure les os plats, comme les vertèbres. Cet os est dit compact, c'est à-dire que 95 % du volume de ce tissu est occupé par la matrice osseuse. À l'inverse, l'os trabéculaire, aussi appelé spongieux, est limité aux métaphyses des os longs et à la partie centrale des os plats. Il ne constitue que 10 % du squelette et la matrice osseuse ne représente que 20 % de ce tissu, le reste étant constitué par le tissu hématopoïétique. La matrice osseuse y est, au niveau microscopique, arrangée en travées connectées entre elles (Lukert *et al.*, 1996).

L'os trabéculaire et l'os cortical sont tous deux formés d'unités fonctionnelles (respectivement 300 000 et 1,4 millions) appelées canaux de Havers dans l'os cortical. Le tissu osseux est composé d'une matrice extracellulaire calcifiée dont les propriétés permettent d'assurer trois fonctions principales: une fonction mécanique assurant le support du poids de l'organisme, une fonction de protection des organes essentiels, et une fonction métabolique liée à la capacité de stocker des minéraux, en particulier le calcium et le phosphate. Pour assurer ces fonctions, le tissu osseux est continuellement renouvelé par un processus complexe et dynamique appelé remodelage osseux qui est réglé au niveau local, puisqu'il survient successivement au sein de chacune des unités fonctionnelles. Le remodelage fait intervenir deux types principaux de cellules osseuses: les

ostéoclastes qui font l'objet de cette thèse et qui résorbent la matrice osseuse et les ostéoblastes qui synthétisent une nouvelle matrice. Ce remodelage permet le maintien de la masse osseuse au cours de la vie adulte normale en assurant l'équilibre entre la formation et la résorption osseuse. Une perturbation de cet équilibre a des répercussions importantes sur l'architecture et la masse osseuse, résultant à long terme en une perte de l'intégrité de la structure du squelette et à des fractures, causes importantes de morbidité et de mortalité au cours du vieillissement et par conséquent des maladies osseuses dont l'ostéoporose et l'ostéopétrose, en particulier l'ostéopétrose récessive létale qui fait l'objet de cette thèse. Le bon déroulement du remodelage nécessite des interactions étroites entre les cellules osseuses, la moelle osseuse et la matrice, interactions qui impliquent des facteurs solubles synthétisés par les cellules ou intégrés dans la matrice. Le déroulement d'un cycle normal de remodelage est le suivant (*figure 1*): tout d'abord, le long de la surface osseuse inactive, recouverte de cellules bordantes ou ostéoblastes quiescents, surviennent les précurseurs mononucléés des ostéoclastes présents dans le sang ou dans la moelle osseuse. Cette phase d'activation, caractérisée par la différenciation des précurseurs ostéoclastiques, est suivie d'une phase de résorption (phase rapide: quelques semaines) de l'os ancien par les ostéoclastes matures, multinucléés et polarisés. Lorsque les ostéoclastes ont terminé leur travail de résorption et creusé une lacune, ils se détachent pour être remplacés par les précurseurs ostéoblastiques qui ont une forme elliptique sans activité

fonctionnelle; c'est la phase d'inversion qui précède la phase de reconstruction (phase lente: plusieurs mois); les ostéoblastes matures surviennent alors dans la lacune et la combent en apposant une nouvelle matrice osseuse; ces ostéoblastes matures présentent une forme cuboïde, avec un noyau apical, un cytoplasme basophile et une synthèse protéique intense. Une fois la matrice osseuse synthétisée (collagène de type I, protéines matricielles et protéoglycanes) et minéralisée (calcium et phosphate), la majorité des cellules s'aplatissent et bordent la surface de l'os. Une partie des ostéoblastes subissent alors un phénomène d'apoptose, le reste s'enfouissant dans la matrice qu'ils ont synthétisée et deviennent des ostéocytes reliés entre eux et aux cellules bordantes de la surface de la matrice par des canalicules. La fonction des ostéocytes ainsi que l'information véhiculée entre les ostéocytes et les cellules bordantes par ces canalicules demeurent inconnues (Lukert *et al.*, 1996).

La durée d'une séquence de remodelage est d'environ trois mois chez l'humain adulte. Les unités fonctionnelles de l'os trabéculaire subissent plus fréquemment le processus du remodelage que celles de l'os cortical en raison de la plus grande surface de contact entre le tissu hématopoïétique et les cellules osseuses dans ce type d'os. On admet donc que, chaque année, un adulte renouvelle 25 % de son os trabéculaire et seulement 4 % de son os cortical. Ainsi, environ 800 unités fonctionnelles sont activées chaque heure dans l'os trabéculaire et 100 dans l'os cortical (Boissy *et al.*, 2000).

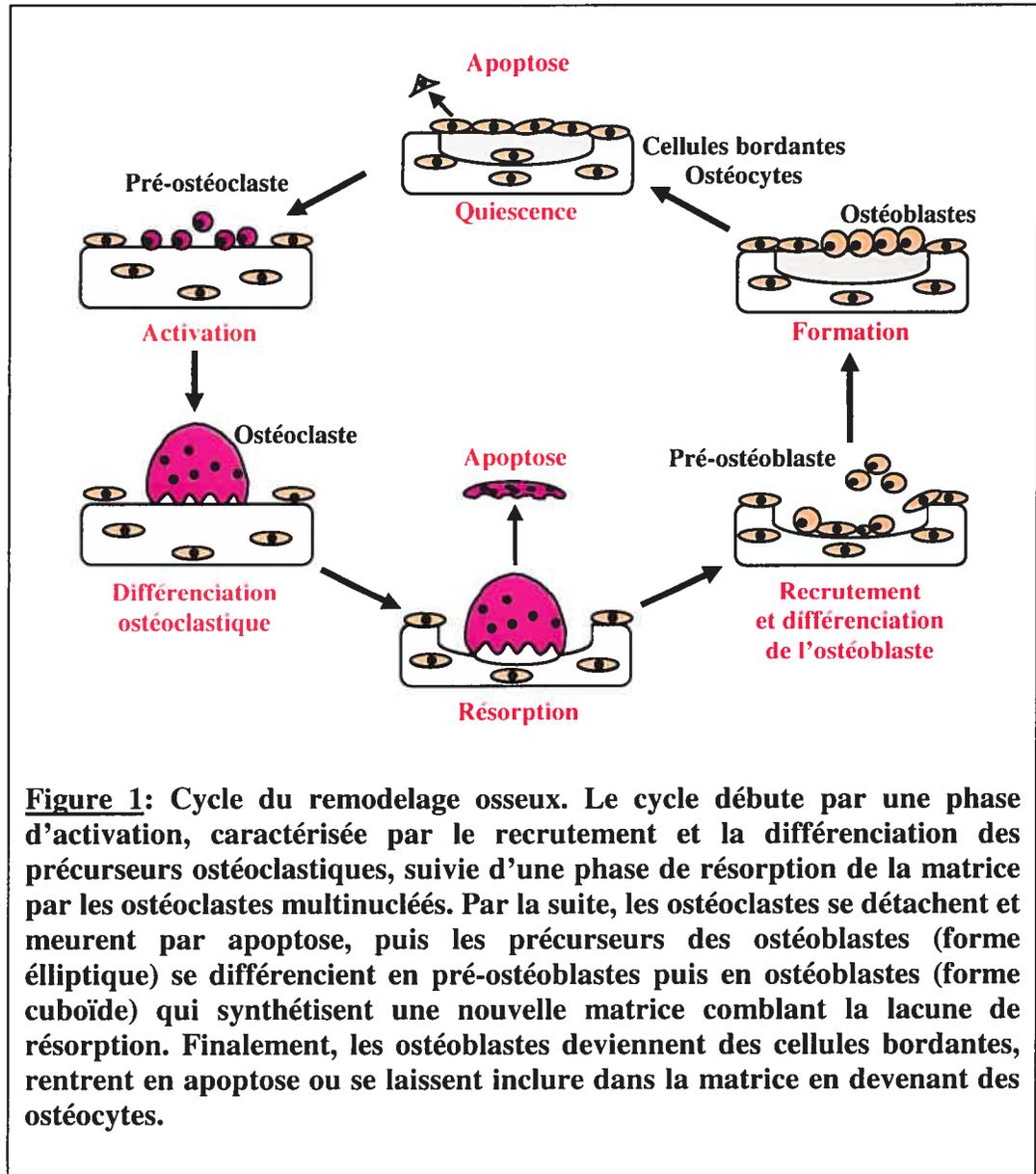


Figure 1: Cycle du remodelage osseux. Le cycle débute par une phase d'activation, caractérisée par le recrutement et la différenciation des précurseurs ostéoclastiques, suivie d'une phase de résorption de la matrice par les ostéoclastes multinucléés. Par la suite, les ostéoclastes se détachent et meurent par apoptose, puis les précurseurs des ostéoblastes (forme elliptique) se différencient en pré-ostéoblastes puis en ostéoblastes (forme cuboïde) qui synthétisent une nouvelle matrice comblant la lacune de résorption. Finalement, les ostéoblastes deviennent des cellules bordantes, rentrent en apoptose ou se laissent inclure dans la matrice en devenant des ostéocytes.

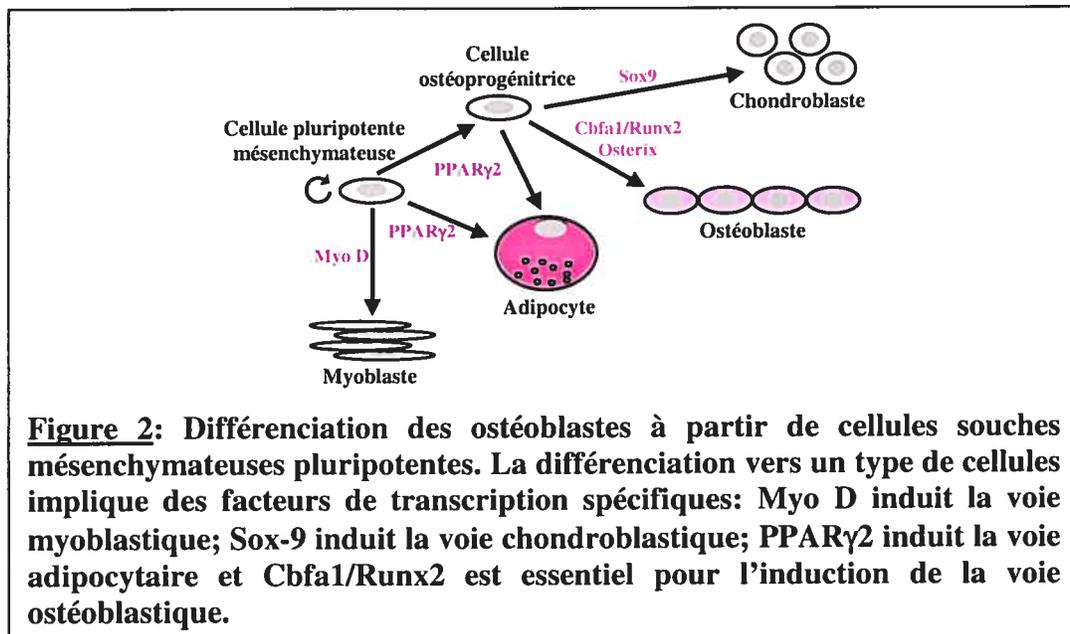
1.1)L'ostéoblaste et la formation osseuse

L'ostéoblaste est la cellule principale chargée de la synthèse et de la minéralisation de la matrice osseuse. Le remodelage osseux semble être sous le contrôle des ostéoblastes qui, par leur production de cytokines et la préparation de la matrice, permettent l'attachement des ostéoclastes aux protéines matricielles et la résorption ostéoclastique. Bien que les ostéoclastes soient l'objet principal de cette thèse, il est inévitable d'aborder le sujet des ostéoblastes puisque ces derniers, comme mentionné précédemment, régulent étroitement la différenciation et l'activité des ostéoclastes en leur fournissant les facteurs essentiels dans ces processus.

1.1.1)Origine de l'ostéoblaste

Deux types d'ossification existent: l'ossification endochondrale qui assure la formation des os longs et qui se caractérise par le dépôt de matrice osseuse sur une matrice cartilagineuse, et l'ossification membranaire qui se fait au niveau des os plats par une apposition directe de matrice extracellulaire sécrétée par les ostéoblastes. Les processus cellulaires et moléculaires impliqués dans ces deux types d'ostéogénèse ne sont pas fondamentalement différents. Au niveau des os plats, les ostéoblastes proviennent de la différenciation de cellules précurseurs mésenchymateuses dérivées de la crête neurale. La formation se fait alors par condensation du mésenchyme. Au niveau de l'endoste (fine membrane conjonctive qui tapisse la cavité médullaire des os longs et des travées du tissu osseux spongieux), les

ostéoblastes originent de la différenciation de cellules souches du stroma médullaire, ces dernières ayant le potentiel de se différencier en cellules cartilagineuses, osseuses, musculaires ou adipocytaires sous l'induction de facteurs locaux et systémiques (Duong et Rodan, 2001). Ces cellules mésenchymateuses sont polyvalentes et peuvent se différencier en chondroblastes, ostéoblastes ou adipocytes (Pittenger *et al.*, 1999). La détermination d'une voie de différenciation implique l'expression temporelle de facteurs de transcription, dont certains sont identifiés. L'expression de Sox-9 (Pittenger *et al.*, 1999) induit la voie chondroblastique, et celle de MyoD (Pittenger *et al.*, 1999) induit la voie myoblastique. L'expression du peroxisome PPAR γ 2 (*proliferator activated receptor γ 2*) (Pittenger *et al.*, 1999) induit la différenciation adipocytaire alors que celle de Cbfa1/Runx2 (Komori *et al.*, 1997) et osterix (Nakashima *et al.*, 2002) est nécessaire pour la différenciation ostéoblastique (figure 2).



1.1.2) Fonctions de l'ostéoblaste

La fonction principale de l'ostéoblaste est de synthétiser et de minéraliser la matrice osseuse au cours de la croissance du squelette, du renouvellement de la matrice osseuse chez l'adulte et de la réparation osseuse tout au long de la vie. La matrice osseuse est composée majoritairement de collagène de type I (90% des protéines) dont le rôle est d'assurer la résistance et l'élasticité de l'os. Les ostéoblastes synthétisent également un grand nombre de protéines matricielles (fibronectine, ostéopontine, ostéonectine, ostéocalcine, vitronectine, sialoprotéine osseuse) qui contiennent des séquences de type RGD impliquées dans l'adhésion des cellules osseuses (ostéoclastes) à la matrice via les intégrines (Gehron, 1989). Ainsi, l'inactivation du gène de l'ostéopontine induit une augmentation de la masse osseuse en diminuant l'adhésion des ostéoclastes à la matrice et donc la résorption osseuse (Yoshitake *et al.*, 1999). Les liaisons intégrines-protéines osseuses jouent aussi un rôle important dans la différenciation ostéoblastique (Franceschi, 1999). Ainsi, la sur-expression d'un dominant négatif de l'intégrine $\beta 1$ induit un défaut de formation osseuse et, par la suite, une ostéopénie chez la souris (Zimmerman *et al.*, 2000). Les ostéoblastes synthétisent également des protéoglycanes, dont certains (biglycane, décorine) sont inclus dans la matrice (Gehron, 1989). Leur rôle serait de contrôler l'activité de facteurs locaux, tels que le TGF β . C'est ainsi que l'inactivation du gène codant pour le biglycane chez la souris a révélé

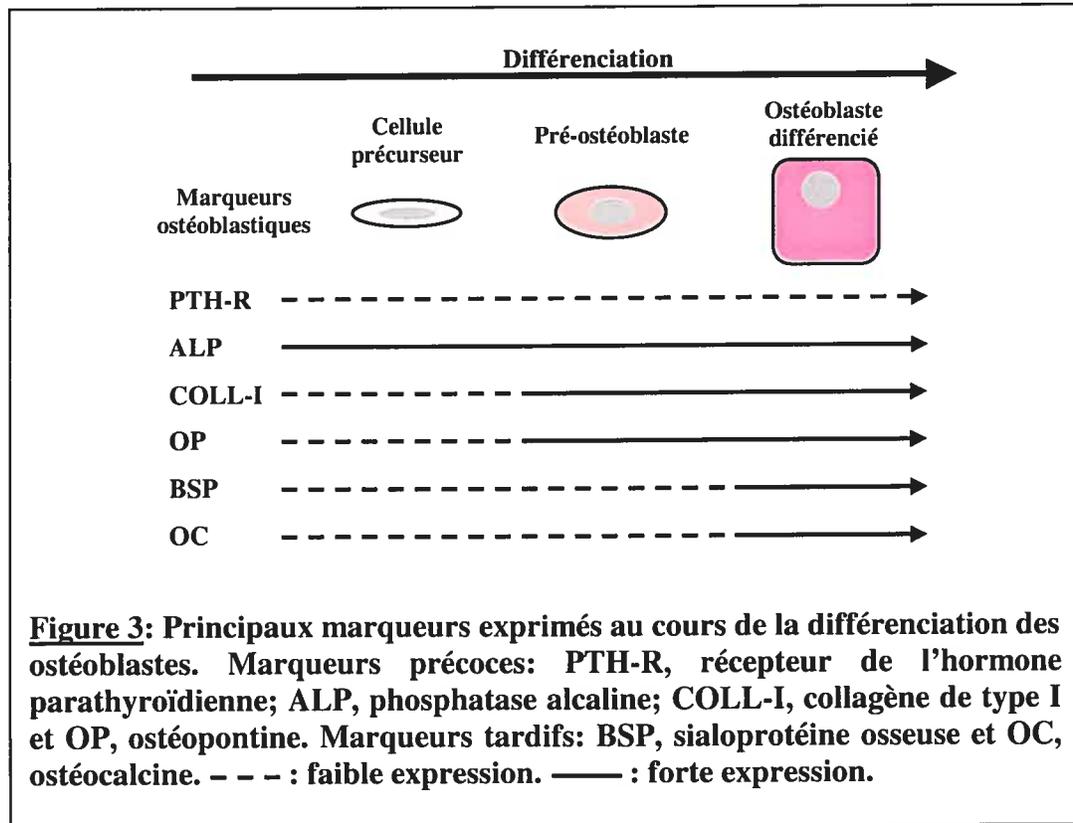
l'induction d'une diminution de la formation osseuse et une ostéopénie (Xu *et al.*, 1998). Enfin, l'ostéoblaste contrôle aussi la dégradation de la matrice osseuse par la production de collagénases. Ainsi, la délétion d'une métalloprotéinase, la MT1-MMP induit un retard de croissance et une ostéopénie chez la souris (Holmbeck *et al.*, 1999). Inversement, l'abolition du clivage du collagène de type I induit une augmentation de la formation osseuse (Zhao *et al.*, 2000b), ce qui suggère que la dégradation de la matrice par l'ostéoblaste influence directement ou indirectement l'ostéogénèse.

La fonction finale de l'ostéoblaste mature est de contribuer à la minéralisation de la matrice osseuse pour la rendre rigide, et cela grâce à la formation de cristaux d'hydroxyapatite qui remplissent les espaces interstitiels et qui nécessite un apport suffisant de minéraux (calcium et phosphate). Le transfert du calcium du milieu extracellulaire aux sites de nucléation présents dans le collagène se fait à la fois par diffusion passive et par transfert actif grâce à des pompes à calcium présentes dans la membrane de l'ostéoblaste. Les ions phosphate sont aussi transférés passivement et activement dans l'ostéoblaste à partir de la matrice par l'intermédiaire d'un système de transport de phosphate dépendant du sodium. Un autre mécanisme implique les phosphatases alcalines de l'ostéoblaste, qui dégradent les pyrophosphates inorganiques, inhibiteurs de la calcification, augmentant ainsi les taux de phosphate nécessaires à la minéralisation. L'invalidation de la phosphatase alcaline chez la souris

induit d'ailleurs une anomalie de la minéralisation, ce qui souligne le rôle présumé de cette enzyme dans le processus de minéralisation (Wennberg *et al.*, 2000). De plus, certaines protéines osseuses telles que l'ostéopontine, l'ostéonectine, la sialoprotéine osseuse et des phosphoprotéines ont des sites de liaison au calcium, ce qui peut contribuer à la mise en route du processus de minéralisation de la matrice osseuse (Gehron, 1989).

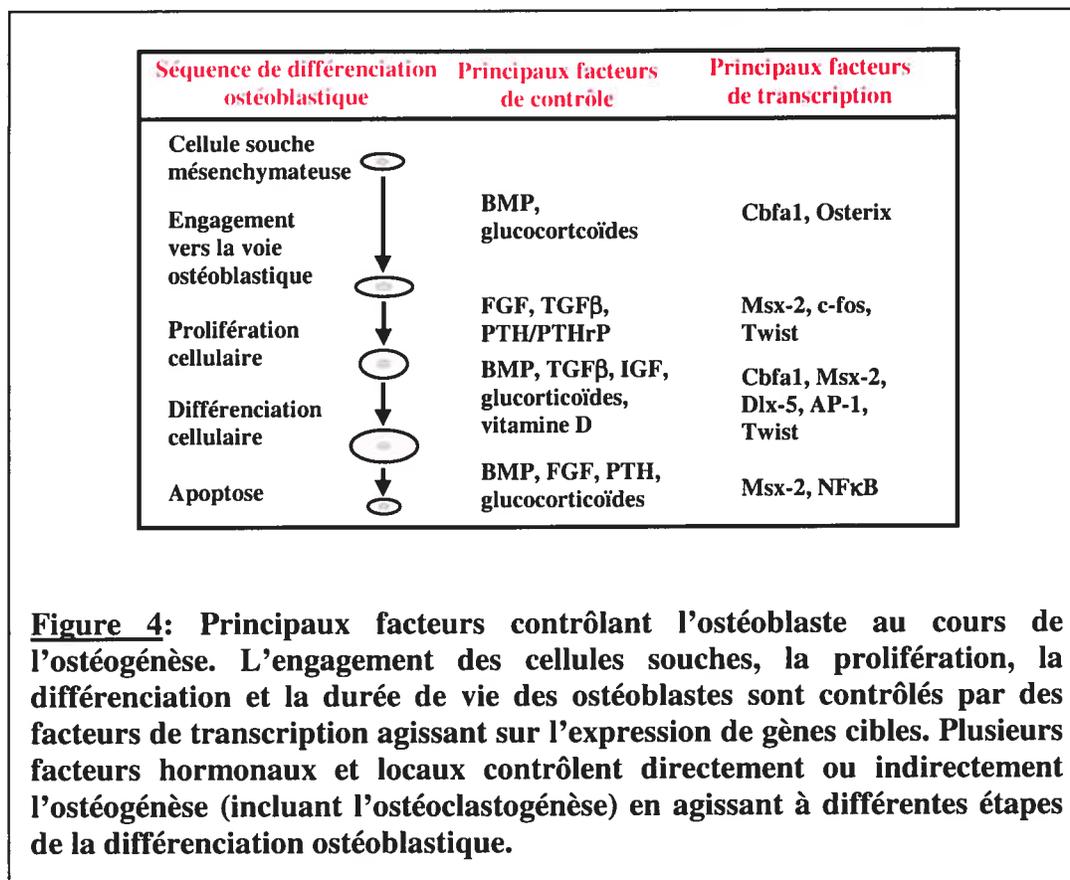
1.1.3) Différenciation et contrôle de l'ostéoblaste

Plusieurs marqueurs sont exprimés de façon séquentielle au cours de la différenciation ostéoblastique. Ce sont soit des marqueurs précoces de type facteur de transcription comme *Cbfa1/Runx2*, soit des marqueurs fonctionnels. La phase de prolifération est associée à l'expression de gènes précoces (*c-fos*, histone H4). Puis la phase de maturation est caractérisée par l'expression de gènes ostéoblastiques et associés à la production de matrice (phosphatase alcaline, collagène de type I, ostéopontine, *transforming growth factor β* [TGF- β], fibronectine). Les ostéoblastes différenciés expriment des marqueurs tardifs (ostéocalcine, sialoprotéine osseuse) au début de la minéralisation de la matrice (*figure 3*).



La formation osseuse est principalement dépendante du nombre d'ostéoblastes différenciés, et la différenciation ostéoblastique est sous le contrôle de facteurs de transcription (Cbfa1/Runx2, deltaFosB, Fra-1, Dlx-5, Msx2 et Twist) (Acampora *et al.*, 1999; Jochum *et al.*, 2000; Komori *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1999; Sabatakos *et al.*, 2000; Yousfi *et al.*, 2001) d'interactions cellulaires (N-cadhérine et connexines) (Hay *et al.*, 2000; Lecanda *et al.*, 2000), de facteurs systémiques (l'hormone parathyroïdienne PTH, les hormones sexuelles comme les œstrogènes, les glucocorticoïdes, la vitamine D3 et la leptine) (Bonnelye *et al.*, 2001; Ducy *et al.*, 2000a; Gardiner *et al.*, 2000; Kousteni *et al.*, 2001; Lukert *et al.*,

1996;Strewler, 2001;Takeda *et al.*, 2002) et de facteurs locaux qui peuvent agir en tant que facteurs autocrines ou paracrines ou servir de relais pour les hormones et les sollicitations mécaniques (IGF-*insuline growth factor*, TGF- β -*transforming growth factor*, les BMP-*bone morphogenetic proteins* et les FGF-*fibroblast growth factor*) (Erlebacher et Derynck, 1996;Kim *et al.*, 1998;Miyakoshi *et al.*, 2001;Yamaguchi *et al.*, 2000;Zhang *et al.*, 2002).



Tous ces facteurs jouent le rôle de régulateurs moléculaires dans le processus de remodelage osseux en agissant directement sur les ostéoblastes

et la formation osseuse ou indirectement sur les ostéoclastes en stimulant la synthèse par les ostéoblastes de molécules régulatrices solubles (OPG, RANKL) et de cytokines (M-CSF, $\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6, IL-11) sécrétées dans le milieu extracellulaire et agissant au niveau des cellules précurseurs des ostéoclastes (Goltzman, 2002).

De plus, le fait que l'arrêt des fonctions gonadiques favorise l'apparition de l'ostéoporose alors que l'obésité prévient la perte osseuse suggère que la masse osseuse, les fonctions gonadiques et la reproduction sont contrôlées par les mêmes hormones (Ducy *et al.*, 2000a; Takeda *et al.*, 2002). Une analyse *in vivo* utilisant des méthodes génétiques et physiologiques a permis de démontrer que la leptine est le plus puissant inhibiteur de la formation osseuse identifié à ce jour. Les mêmes études *in vivo* ont permis de démontrer également que cette fonction de la leptine, comme les autres, requiert sa liaison à un récepteur hypothalamique. Cette étude démontre que, comme la plupart des autres fonctions homéostatiques, le remodelage osseux est sous le contrôle de l'hypothalamus. Cette étude suggère aussi que les maladies osseuses dégénératives telle que l'ostéoporose pourraient être en partie d'origine hypothalamique.

Comme nous le verrons dans les prochains paragraphes, cette régulation du remodelage osseux joue un rôle majeur dans le contrôle de la résorption ostéoclastique et de la masse osseuse.

1.2) L'ostéoclaste et la résorption osseuse

Cette thèse porte principalement sur l'ostéoclaste qui est la seule cellule en charge de la résorption osseuse. Il n'est pas certain que d'autres cellules, en particulier les macrophages, ou des cellules cancéreuses qui résorbent des particules osseuses *in vitro*, puissent résorber l'os *in vivo*. La fonction et la régulation de l'ostéoclaste sont les mieux connues des cellules osseuses, autant sur le plan cellulaire que moléculaire et cela grâce à la culture *in vitro* d'ostéoclastes (OCL : Osteoclast Like Cell) et à la génération de modèles animaux, en particulier la souris. L'ostéoclaste est d'origine hématopoïétique et plusieurs facteurs essentiels à sa différenciation, fonction et régulation ont été identifiés au cours de la dernière décennie. L'ostéoclaste fonctionne de manière cyclique, alternant des phases migratoires le long de la surface osseuse et des phases de résorption active créant des lacunes osseuses. L'ostéoclaste actif se caractérise par sa bipolarité morphologique et fonctionnelle. En pathologie, une anomalie génétique ou acquise de la régulation de la résorption osseuse peut conduire à une ostéoporose ou une ostéopétrose selon que la résorption excède la formation osseuse ou au contraire est anormalement diminuée. L'ostéopétrose est la maladie qui sera abordée dans cette thèse. La compréhension de la biologie de l'ostéoclaste est donc essentielle et l'objectif des prochains paragraphes est de résumer l'état actuel de nos connaissances sur l'ostéoclaste et sur le processus de résorption osseuse.

1.2.1) Origine et différenciation de l'ostéoclaste

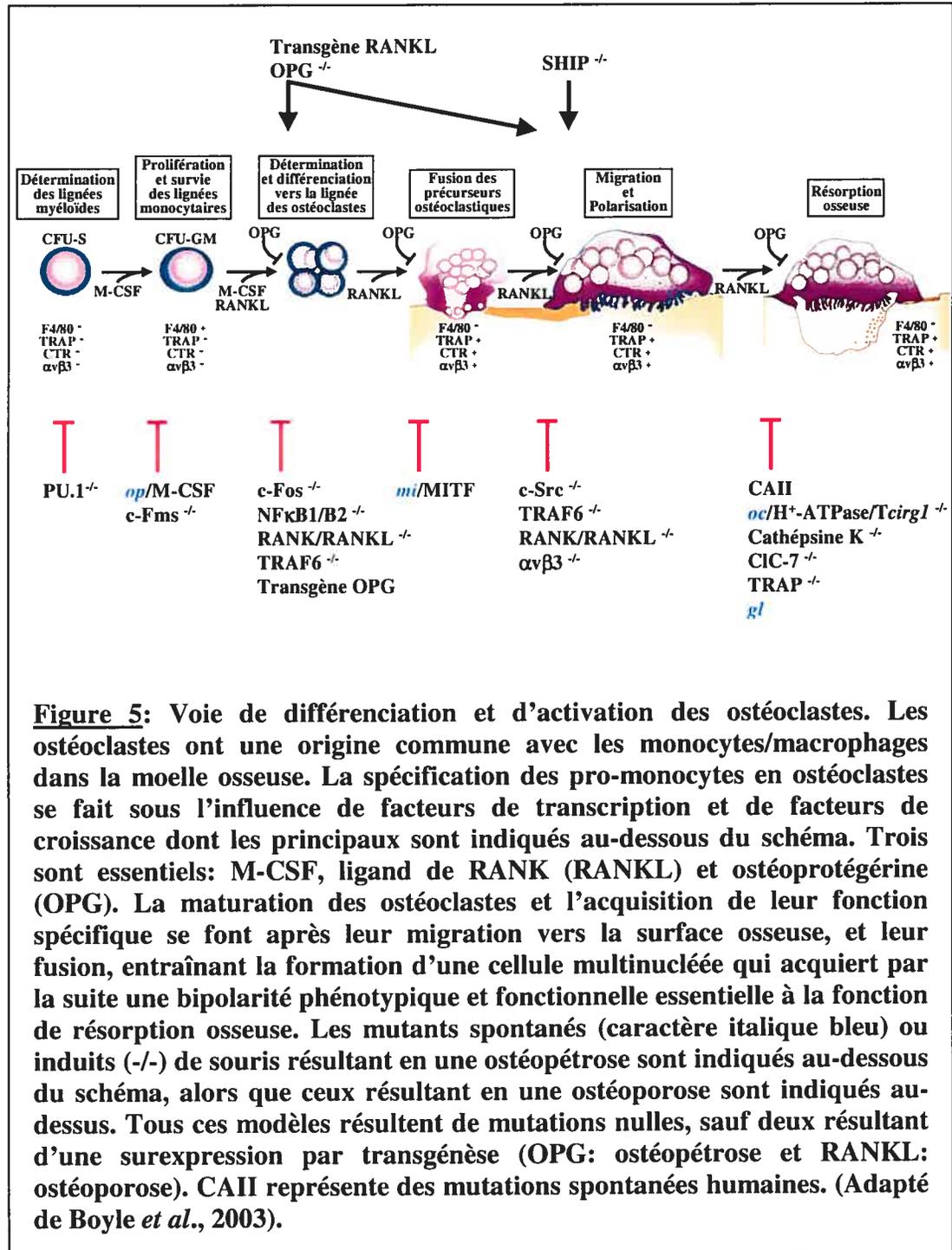
L'ostéoclaste fut décrit pour la première fois en 1873 par Albert Kölliker (Lerner, 2000). C'est une cellule volumineuse multinucléée d'origine hématopoïétique (*figure 5*) dérivant des précurseurs communs aux monocytes/macrophages de la lignée myéloïde. Ces précurseurs peuvent se différencier en monocytes/macrophages, en cellules dendritiques ou en ostéoclastes en fonction des facteurs présents dans leur environnement. Au cours de la dernière décennie, il a été fermement établi que la différenciation des ostéoclastes nécessite des interactions étroites avec des cellules stromales, population dont sont issus les ostéoblastes (Ducy *et al.*, 2000b). Ces interactions qui se déroulent dans le micro-environnement de la moelle osseuse, impliquent des facteurs synthétisés par les cellules stromales/ostéoblastes et des contacts directs entre ces dernières et les précurseurs ostéoclastiques.

Ces facteurs, dont plusieurs sont identifiés, sont soit exprimés à la surface des cellules stromales/ostéoblastes, d'où ils peuvent être libérés par protéolyse, soit directement sécrétés. Ces facteurs interviennent ensuite dans le déclenchement de plusieurs voies de signalisation contrôlant la différenciation ou la fonction de l'ostéoclaste. Les trois facteurs extracellulaires clés contrôlant ce processus sont le M-CSF (*macrophage-colony stimulating factor*), RANKL (*receptor activator of NF κ B ligand*) et son antagoniste OPG (*osteoprotegerin*) (Lacey *et al.*, 1998; Simonet *et al.*,

1997;Teitelbaum, 2000). L'addition de M-CSF et de RANKL est suffisante pour induire une différenciation des précurseurs monocytaires en ostéoclastes *in vitro*, compensant ainsi le besoin d'ostéoblastes dans ces cultures. En revanche, l'addition d'OPG inhibe complètement la différenciation ostéoclastique.

M-CSF et RANKL existent sous deux formes: membranaire et soluble. RANKL est un membre de la famille des TNF (*tumor necrosis factor*) et sa forme soluble résulte du clivage de sa forme transmembranaire par des métalloprotéases de type ADAM.

RANK et OPG sont des membres de la famille des récepteurs du TNF (Simonet *et al.*, 1997;Teitelbaum, 2000). OPG est un récepteur sécrété/soluble «*decoy ou leurre*» qui ressemble au récepteur RANK présent sur les précurseurs ostéoclastiques et est capable de compétitionner avec RANK pour la liaison au RANKL afin de bloquer l'effet de ce dernier sur la différenciation ostéoclastique (Lacey *et al.*, 1998;Simonet *et al.*, 1997) (*figure 6*). L'importance clé de ces trois facteurs a été confirmée par des études génétiques sur des modèles animaux, en particulier des mutants induits ou spontanés de souris et des souris transgéniques.



D'autres facteurs intracellulaires agissant en amont de la sécrétion des molécules mentionnées précédemment (et donc dans les cellules stromales, les ostéoblastes, les synoviocytes ou des lymphocytes T), ou en aval de leurs récepteurs (et donc dans les monocytes, les cellules dendritiques ou les ostéoclastes), ont aussi été identifiés et leur importance dans la différenciation ostéoclastique bien établie, et cela en se servant des modèles de souris. Ces facteurs sont NF κ B et TRAF6 qui agissent en aval de RANK, et TNF dont l'action se situe en partie en amont de RANKL, et en partie directement sur l'ostéoclaste. Comme nous le verrons plus loin, l'inactivation ou la surexpression de ces gènes engendrent des anomalies osseuses chez la souris dont l'ostéopétrose ou l'ostéoporose (Bucay *et al.*, 1998; Dougall *et al.*, 1999; Franzoso *et al.*, 1997; Kong *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000b; Rodan et Martin, 2000; Suda *et al.*, 1999).

La plupart des agents dont l'action sur la différenciation de l'ostéoclaste était bien connue, tels la parathormone (PTH) et son peptide apparenté (*related-peptide*) (PTHrP), le métabolite actif de la vitamine D (1,25 OH₂D₃), et certaines interleukines (IL-6 et IL-11), agissent indirectement sur les précurseurs de l'ostéoclaste, alors que d'autres (TNF et IL-1) agissent directement sur ces précurseurs. En effet, les facteurs agissant indirectement, interviennent au niveau de l'expression de RANKL et/ou d'OPG par les cellules stromales ou les ostéoblastes. C'est le rapport quantitatif entre ces deux protéines solubles antagonistes (RANKL et OPG)

qui détermine le nombre d'ostéoclastes formés le long des surfaces osseuses, ainsi que leur activité (*figure 6*).

À noter que la différenciation des précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes matures consiste en plusieurs étapes majeures contrôlées par plusieurs facteurs, dont le facteur de transcription PU-1 qui est nécessaire au niveau de l'engagement d'un précurseur myéloïde vers la voie ostéoclastique, le M-CSF assure la prolifération et la survie des précurseurs déterminés, et RANKL intervient dans l'étape de différenciation (Arai *et al.*, 1999). Cependant, d'autres facteurs essentiels ont été impliqués tardivement dans cette voie de différenciation et cela grâce aux modèles de souris. Ces facteurs sont: le facteur de transcription Mitf (*microphthalmia*) impliqué dans la fusion des précurseurs ostéoclastique (Hodgkinson *et al.*, 1993; Thesingh et Scherft, 1985); le proto-oncogène c-Src (Soriano *et al.*, 1991), TRAF6 (Lomaga *et al.*, 1999) et les intégrines de type α v β 3 (McHugh *et al.*, 2000) impliqués dans la migration, l'attachement et la polarisation de l'ostéoclaste; et finalement la pompe à proton (v)-ATPase (Li *et al.*, 1999; Scimeca *et al.*, 2000), le canal de chlore ClC-7 (Kornak *et al.*, 2001), l'anhydrase carbonique CAII (Hu *et al.*, 1992) et la cathépsine K (Saftig *et al.*, 1998) qui sont important au niveau de la fonction résorptive de l'ostéoclaste, particulièrement l'acidification et la dégradation de la matrice (*figure 5*).

De plus les facteurs solubles (RANK et RANKL) essentiels à la différenciation des ostéoclastes sont aussi essentiels à la différenciation et à la fonction des cellules du système immunitaire telles que les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes B et T. En conséquence, les altérations génétiques de ces facteurs entraînent non seulement un phénotype osseux mais aussi des anomalies du système immunitaire (Bucay *et al.*, 1998; Dougall *et al.*, 1999; Kong *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000b).

Bien qu'il ne soit pas possible de préciser aujourd'hui leurs liens avec les systèmes M-CSF ou RANK/RANKL, d'autres signaux dont les mutations affectent la différenciation ostéoclastique ont été identifiés. Parmi ceux-ci, la famille des facteurs de transcription de type AP-1 joue un rôle important. Cette famille comprend deux sous-groupes, Fos et Jun. La délétion de c-Fos conduit à une absence de formation des ostéoclastes à partir des précurseurs hématopoïétiques, alors que les macrophages se différencient normalement (Grigoriadis *et al.*, 1994). De même, la surexpression de Fra-1, un membre de la famille Fos, entraîne une augmentation de l'ostéoclastogénèse (Jochum *et al.*, 2000) (*figure 7*). Des évidences récentes ont permis d'élucider le lien entre RANKL et c-Fos dans la régulation de l'homéostasie osseuse. L'induction de l'ostéoclastogénèse par RANKL résulte en une induction et une sécrétion de l'*interféron- β* (INF- β) qui régule négativement l'expression de c-Fos par un mécanisme autocrine et par conséquent l'ostéoclastogénèse (Takayanagi *et al.*, 2002). Cela est

supporté par les expériences d'inactivation génique de l'INF- β qui résulte en une sévère ostéopénie (forme d'ostéoporose) associée à une ostéoclastogénèse accrue (Takayanagi *et al.*, 2002). Cela démontre un rôle crucial de RANKL, non seulement dans l'induction de l'ostéoclastogénèse, mais aussi dans sa régulation.

Récemment, des essais *in vitro* d'inhibition ou de sur-expression du facteur de transcription NFAT2 (*nuclear factor of activating T cells*) dans les cellules RAW264.7 ou des cellules ES, ont démontré un rôle crucial de ce facteur dans la différenciation des ostéoclastes en réponse au RANKL (Ishida *et al.*, 2002; Takayanagi *et al.*, 2002).

1.2.2) Mécanisme de la résorption osseuse

La différenciation en ostéoclaste mature capable de résorber l'os nécessite, suite à des signaux chimiotactiques, une migration des précurseurs ostéoclastiques de la moelle osseuse vers la surface osseuse où l'ostéoclaste acquérera des caractéristiques morphologiques particulières:

une cellule multinucléée; une bordure plissée (*ruffled border*) du côté apical en contact avec la matrice osseuse et responsable de la sécrétion vésiculaire (ions et enzymes); une zone d'attachement (*sealing zone* ou *clear zone*) permettant l'adhésion de l'ostéoclaste à son substrat et du scellement de la lacune de résorption pour assurer un pH acide, et située du côté apical; et

un pôle basolatéral en contact avec le micro-environnement (moelle osseuse et périoste) et en charge des fonctions régulatrices (récepteurs, transduction du signal et exocytose après transcytose des produits dégradés de la matrice) (Baron *et al.*, 1985; Baron *et al.*, 1986; Baron *et al.*, 1988; Nesbitt et Horton, 1997; Salo *et al.*, 1997; Vaananen et Horton, 1995) (*figure 6*).

1.2.2.1) Attachement et migration de l'ostéoclaste

Au cours de la résorption osseuse, l'ostéoclaste se déplace le long de la surface osseuse, créant une succession de lacunes de résorption, son activité alternant phases de résorption et de migration. Pendant la résorption, le cytosquelette de l'ostéoclaste subit des remaniements majeurs au niveau de la zone d'attachement. Un anneau périphérique d'actine se forme délimitant ainsi la zone de résorption et l'isolant de son environnement. Cet anneau est constitué de podosomes (structures ponctiformes) dans lesquels les filaments d'actine sont orientés perpendiculairement à la membrane plasmique. Lorsque l'ostéoclaste est en mouvement, on observe peu de podosomes qui sont confinés au bord antérieur de l'ostéoclaste ou *lamellipodium*. Outre les filaments d'actine, les podosomes contiennent des protéines d'adhésion focale (*focal adhesion*) impliquées dans les interactions cellule/cellule ou cellule/substrat, dont la fimbrine, l'actinine, la gelsoline, la cortactine, la vinculine et la taline qui sont associées aux filaments d'actine. De plus, des molécules impliquées dans la transduction du signal sont aussi présentes dans ces sites d'adhésion, telles c-Src, c-Cbl, Pyk2 ou FAK (*focal*

adhesion kinase), PI3-kinase, etc. (*figure 7*). Celles-ci jouent un rôle clé dans l'assemblage et le désassemblage des structures d'adhésion, processus nécessaire à la migration de l'ostéoclaste (Wang *et al.*, 2003).

l'intégrine $\alpha v \beta 3$

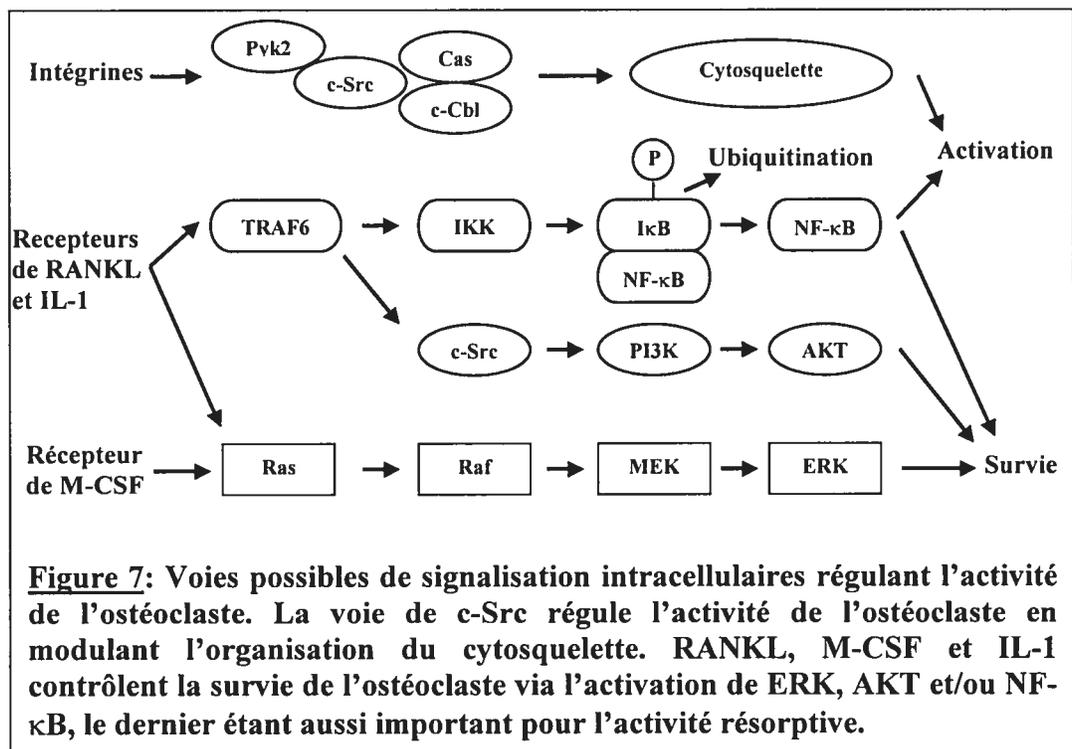
Le recrutement et la motilité de l'ostéoclaste sont régulés par des récepteurs membranaires à l'origine de voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la réorganisation du cytosquelette. Les interactions entre l'ostéoclaste et l'os sont déterminées par les intégrines, en particulier $\alpha v \beta 3$, qui est fortement exprimée au niveau de la zone d'attachement de l'ostéoclaste actif et qui est déterminante pour l'adhésion, la motilité et l'activation de l'ostéoclaste (Vaananen *et al.*, 1995). Comme toutes les intégrines, $\alpha v \beta 3$ (le récepteur de la vitronectine) reconnaît une séquence RGD (Arg-Gly-Asp) présente dans les protéines de la matrice osseuse (collagène, fibronectine, ostéopontine, sialoprotéine, vitronectine, etc.). L'importance fonctionnelle de $\alpha v \beta 3$ dans la résorption ostéoclastique et le processus d'attachement des ostéoclastes à la surface osseuse fut démontrée suite à la délétion du gène codant pour la sous-unité $\beta 3$ qui entraîne une diminution de la résorption osseuse résultant en une ostéosclérose (McHugh *et al.*, 2000) et suite à la caractérisation du mutant induit du proto-oncogène c-Src chez la souris.

le proto-oncogène c-Src

En effet, la délétion du gène codant pour c-Src entraîne une ostéopétrose chez la souris découlant d'une altération de l'activité fonctionnelle de l'ostéoclaste et non de sa différenciation (Lowe *et al.*, 1993; Soriano *et al.*, 1991), excluant ainsi les voies de signalisation *via* les récepteurs du M-CSF, RANK/TRAF6 et des œstrogènes dans lesquelles c-Src est impliqué (Kousteni *et al.*, 2001). Les dernières données semblent indiquer que l'un des rôles de Src dans la résorption osseuse soit lié aux voies de signalisation des intégrines: l'activation d'un groupe de récepteurs au contact du substrat entraîne une activation des tyrosines kinases Pyk2 et Src, déclenchant l'assemblage d'un complexe moléculaire comprenant de nombreuses protéines du cytosquelette telle Cas par exemple. Dans ce complexe se trouve aussi le proto-oncogène Cbl qui, par ses interactions directes avec Src entraîne l'inhibition des kinases et la dégradation du complexe moléculaire par la voie de l'ubiquitination (Joazeiro *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2003). Cela entraîne une inhibition *inside-out* de l'affinité des intégrines et un déclenchement du point focal d'adhésion, assurant ainsi la mobilité cellulaire (Sanjay *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2003). L'importance de ces phénomènes de migration pour la résorption osseuse est confirmée par la similitude des phénotypes des souris c-Src^{-/-}, c-Cbl^{-/-} ou Pyk2^{-/-} (Sanjay *et al.*, 2001) où l'on observe une diminution de la migration des ostéoclastes, et celui qu'engendre la délétion des protéines associées aux podosomes comme la gelsoline par exemple (Chellaiah *et al.*, 2000) (*figure*

7). Récemment, une interaction entre Pyk2 et la gelsoline a été démontrée et impliquée dans la régulation de la formation de l'anneau d'actine dans les ostéoclastes (Wang *et al.*, 2003).

De plus, des études récentes d'activation de la voie des MAP kinases (MEK1 et ERK) ont démontré son implication dans la survie des ostéoclastes (Miyazaki *et al.*, 2000). À l'opposé, l'inhibition de la voie de ERK dans les ostéoclastes par la surexpression d'un dominant négatif du gène *ras* induit une mort cellulaire des ostéoclastes par apoptose. Les facteurs anti-apoptotiques RANKL, IL-1 et M-CSF induisent l'activation de ERK, suggérant un rôle essentiel de la voie de Ras-ERK dans la survie des ostéoclastes (Tanaka *et al.*, 2003) (figure 7).



1.2.2.2) Dissolution et dégradation de la matrice osseuse

Enzymes lysosomiales et les métalloprotéases

L'ostéoclaste synthétise et sécrète par sa bordure plissée apicale plusieurs types d'enzymes: il s'agit de phosphatases acides (TRAP: Tartrate-Resistant Acid Phosphatase, par exemple), d'arylsulfatases, de la β -glucuronidase, de la β -glycérophosphatase et de diverses cystéine-protéinases incluant les cathépsines B, C, D, L et la cathépsine K qui est capable de dégrader complètement le collagène à pH acide et dont la délétion du gène chez la souris entraîne un phénotype osseux (Saftig *et al.*, 1998). L'ostéoclaste sécrète aussi des métalloprotéases (gélatinases, collagénases de types I et IV, stromélysines) qui participent aussi à la résorption osseuse (Teitelbaum, 2000). Ainsi, c'est la coopération d'une série d'enzymes actives à pH acide ou neutre qui assure une dégradation complète de la matrice extracellulaire dans les lacunes de résorption (*figure 6*).

Processus d'acidification et équilibre ionique

La membrane apicale de l'ostéoclaste actif, en particulier la bordure plissée, est le siège d'une sécrétion spécifique d'enzymes protéolytiques qui dégradent la matrice osseuse dissoute, mais aussi de protons qui acidifient le compartiment de résorption osseuse (Blair *et al.*, 1989; Rousselle et Heymann, 2002) (*figure 8*). La pompe à proton ATPasique de l'ostéoclaste

est du type vacuolaire et ressemble beaucoup aux pompes des lysosomes et des membranes des cellules tubulaires rénales (Chatterjee *et al.*, 1992). Cependant, c'est une sous-unité ($\alpha 3$: 116 kD) spécifique à l'ostéoclaste qui intervient dans la résorption osseuse en formant un complexe avec d'autres sous-unités dont l'expression est ubiquitaire. En effet, la délétion de cette sous-unité (116 kD) chez la souris par *knock-out* (Li *et al.*, 1999), comme la mutation spontanée dans le même gène chez la souris *oc* (Scimeca *et al.*, 2000), entraînent une ostéopétrose fonctionnelle chez la souris, sans perturber la différenciation des ostéoclastes. De plus, un phénotype rénal au niveau des tubules proximaux a été reporté chez ce modèle d'ostéopétrose, suggérant un rôle important au niveau de l'acidification rénale (Nakamura *et al.*, 1997). L'importance de cette sous-unité a été démontrée récemment par l'identification de plusieurs mutations inactivantes chez des patients atteints d'ostéopétrose infantile maligne (voir section 3) (Sobacchi *et al.*, 2001).

Parallèlement à ces pompes à protons, la bordure plissée exprime des canaux à chlore (Blair *et al.*, 1991), l'excrétion de cet anion dans la lacune de résorption étant absolument indispensable au processus d'acidification (*figure 8*) afin de maintenir l'équilibre des charges des deux côtés de cette membrane apicale et prévenir ainsi la création d'un gradient de charge qui inhiberait la pompe à protons. L'importance des canaux à chlore vient d'être démontrée par l'invalidation de ce gène chez la souris qui résulte en

une ostéopétrose sévère et par la découverte de mutations inactivantes chez des patients ostéopérotiques (voir section 3) (Kornak *et al.*, 2001) (*figure 8*). La membrane basolatérale de l'ostéoclaste joue un rôle essentiel dans le processus d'acidification et le maintien de l'équilibre ionique, et cela par une coordination entre ses pompes à ions électrogènes, ses canaux ioniques et ses échangeurs ioniques neutres qui permettent de maintenir le pH du cytoplasme et le potentiel transmembranaire dans des limites physiologiques étroites (*figure 8*). En fait, l'ostéoclaste compte à la fois un échangeur d'acide (Na^+/H^+) pour maintenir le pH intracellulaire, et un échangeur de base ($\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$) qui acidifie le cytoplasme (Ravesloot *et al.*, 1995; Teti *et al.*, 1989). Les protons sont produits par l'anhydrase carbonique (CAII) présente dans le cytoplasme de l'ostéoclaste et dont des mutations inactivantes du gène entraînent une forme d'ostéopétrose chez les humains et une acidose tubulaire rénale (Hu *et al.*, 1992). Cependant, chez la souris mutante pour le même gène, seulement le phénotype rénal a été observé et le phénotype ostéopérotique ne s'est jamais exprimé, même chez les souris âgées (Lewis *et al.*, 1988). À noter que le mode d'action principal de la calcitonine, un inhibiteur des ostéoclastes, fait intervenir une régulation de plusieurs transporteurs ioniques de la membrane basolatérale (Santhanagopal *et al.*, 2001).

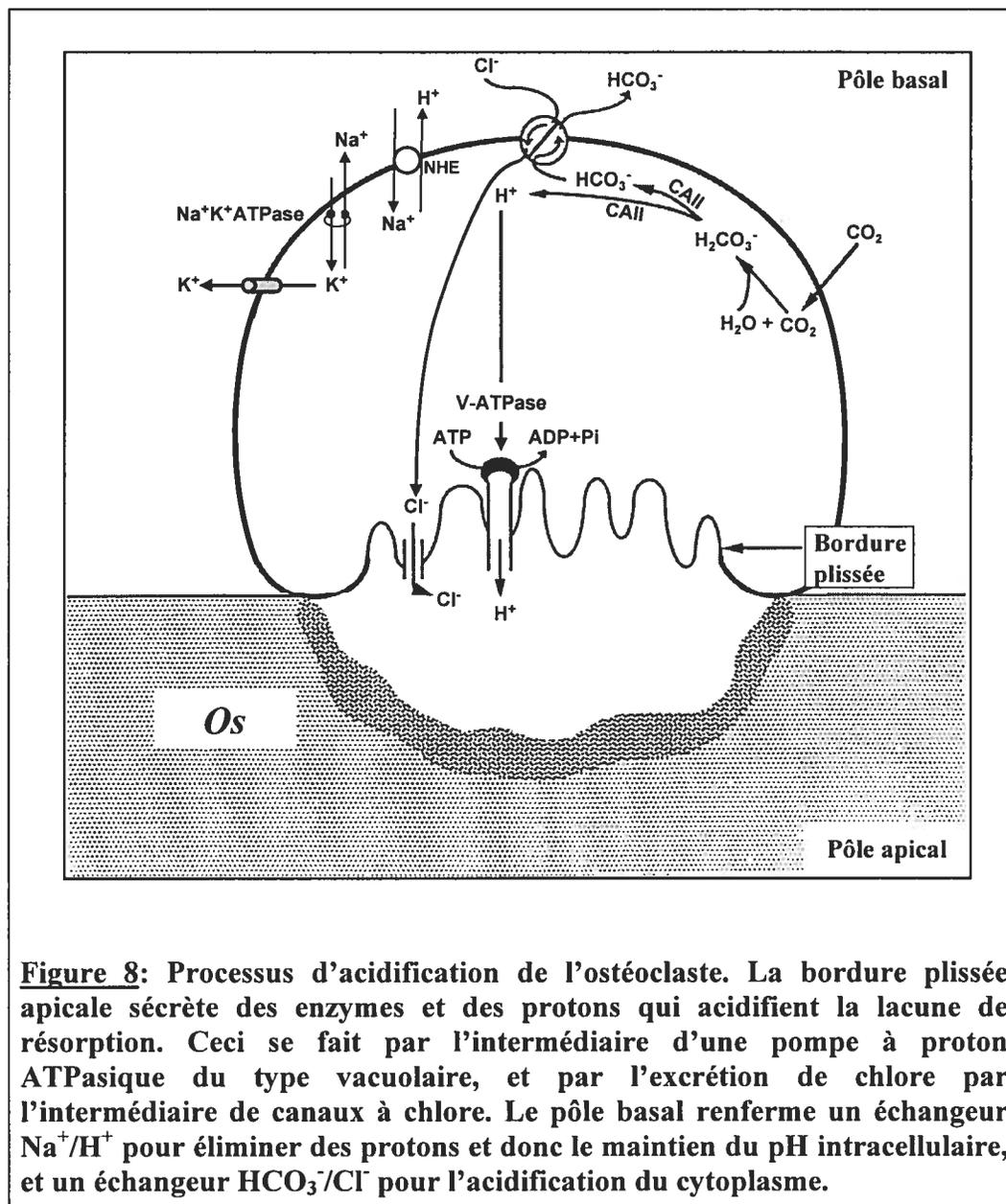


Figure 8: Processus d'acidification de l'ostéoclaste. La bordure plissée apicale sécrète des enzymes et des protons qui acidifient la lacune de résorption. Ceci se fait par l'intermédiaire d'une pompe à proton ATPasique du type vacuolaire, et par l'excrétion de chlore par l'intermédiaire de canaux à chlore. Le pôle basal renferme un échangeur Na⁺/H⁺ pour éliminer des protons et donc le maintien du pH intracellulaire, et un échangeur HCO₃⁻/Cl⁻ pour l'acidification du cytoplasme.

1.2.2.3) Apoptose et contrôle de la résorption osseuse

Comme indiqué plus haut, l'ostéoclaste fonctionne de manière cyclique, allant de phases migratoires le long de la surface osseuse à des phases de résorption active et vice-versa. Le temps de vie d'un ostéoclaste est de 2 semaines, avec une demie-vie allant de 6 à 10 jours. Les facteurs contrôlant ces cycles ne sont pas connus mais la possibilité que l'augmentation de la concentration en calcium dans la lacune de résorption déclenche, par l'intermédiaire d'un récepteur au calcium, le détachement et la migration de la cellule a été évoquée. Après un nombre probablement déterminé de cycles, l'ostéoclaste entre dans une phase d'apoptose et disparaît.

Le rôle de l'apoptose dans la régulation de la résorption osseuse est maintenant clairement établi, et l'activité négative des œstrogènes sur la résorption s'exercent surtout par l'induction de l'apoptose ostéoclastique via l'activation du TGF β (*figure6*) (Hughes *et al.*, 1996). De même, les agents thérapeutiques qui bloquent la résorption et que sont les biphosphonates agissent principalement en induisant l'apoptose des ostéoclastes (Manolagas *et al.*, 2002; Reszka *et al.*, 1999). De plus, par son inhibition de l'apoptose des ostéoblastes, la PTH a été indirectement impliquée dans la différenciation et l'activation des ostéoclastes, et par conséquent dans l'induction de la résorption osseuse (Jilka *et al.*, 1999).

2) Désordres squelettiques et modèles animaux

L'analyse des nombreuses mutations génétiques affectant le squelette chez la souris, qu'elles soient spontanées ou induites, explique la progression rapide de nos connaissances sur le développement osseux et l'homéostasie osseuse. Dans plusieurs cas, ces mutants de souris représentent des modèles animaux pertinents pour des maladies humaines, dont l'ostéoporose et l'ostéopétrose.

2.1) Désordres squelettiques

Contrairement à son apparence figée, le squelette des vertébrés subit d'importants remaniements continus dictés par l'activité de deux populations de cellules osseuses : les ostéoclastes qui dégradent l'os ancien et les ostéoblastes qui synthétisent la nouvelle matrice minéralisée. Ces remaniements ont lieu en situation physiologique :

- Lors de la croissance du squelette, pendant laquelle les os s'allongent, s'élargissent et sont modelés pour atteindre une taille adulte tout en conservant leur forme d'origine. La croissance et le modelage osseux sont caractérisés par une dissociation anatomique de l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes.
- Durant la vie adulte, lors du remodelage osseux qui permet un renouvellement continu de la matrice osseuse au niveau de petites régions

de l'os appelées unités de remodelage. Dans ce cas, les ostéoclastes et ostéoblastes exercent successivement leur activité sur le même site en étroite coordination.

Ces remaniements peuvent être la cause de pathologies squelettiques humaines lorsqu'il apparaît un déséquilibre entre l'activité des ostéoclastes et celle des ostéoblastes :

- L'ostéoporose, affection associée principalement avec le vieillissement, se caractérise par une diminution de la masse osseuse (due à une diminution de la formation osseuse [ostéopénie] ou une augmentation de la résorption osseuse [Paget]) qui rend le squelette des personnes atteintes sujet à de nombreuses fractures. Il existe différentes formes d'ostéoporose, dont la plus fréquente touche les femmes après la ménopause. L'étude des modèles animaux révèle que la baisse de production des œstrogènes par l'organisme (ovariectomie par exemple) induit une augmentation de la différenciation des ostéoclastes ainsi qu'une inhibition de leur apoptose dans l'os.

- L'ostéopétrose, à l'opposé de l'ostéoporose, se traduit par une augmentation générale de la masse osseuse entraînant une diminution de la cavité médullaire qui contient les précurseurs hématopoïétiques. L'os devient plus rigide et plus susceptible aux fractures. C'est une maladie assez rare chez les humains et les formes caractérisées résultent d'une activité

réduite des ostéoclastes due à des mutations dans des gènes impliqués directement (défauts intrinsèques) ou indirectement (via les ostéoblastes ou les cellules immunitaires) dans la résorption de l'os.

- **Les patients atteints de la maladie de Paget présentent, eux, une dysmorphie de leur squelette, due à un remodelage osseux excessif et désordonné pouvant être, dans les cas extrêmes, 20 fois plus élevé que chez un individu normal. Ce désordre osseux est lié à une suractivité des ostéoclastes qui accélère le processus de remodelage, conduisant les ostéoblastes à former une matrice osseuse anormale, désorganisée en structure.**

- **La présence de cellules cancéreuses dans les os peut conduire également à l'apparition de lésions osseuses localisées appelées ostéolyses. En effet, certaines métastases osseuses de nombreuses tumeurs primaires (cancer du sein et myélome multiple par exemple) libèrent des facteurs (TNF) susceptibles de stimuler localement l'activité de résorption des ostéoclastes. Il en est de même pour de nombreux processus inflammatoires, qu'ils soient articulaires, telles l'arthrite rhumatoïde ou l'ostéoarthrite, ou osseux, telles les parodontopathies.**

Il faut ajouter à ces remaniements dictés par l'organisme, l'extraordinaire capacité du squelette à s'adapter aux contraintes extérieures. La diminution

à long terme de la masse osseuse des spationautes qui échappent à la gravité terrestre, en est la meilleure illustration. Des études expérimentales ont clairement montré que des pressions physiques constantes ou répétées exercées sur des membres d'animaux vivants conduisent à une réorganisation du tissu osseux grâce à une activité découplée des ostéoblastes et des ostéoclastes (Boissy *et al.*, 2000).

2.2) Modèles animaux de l'ostéoporose

Les modèles de souris ostéoporotiques n'ont pas eu d'impact majeur sur l'ostéoporose humaine, puisqu'aucun de leurs homologues humains n'a pu être associé génétiquement (mutations identifiées) avec la maladie chez les patients ostéoporotiques. La plupart de ces modèles ont été générés par l'inactivation des gènes codant pour des protéines de la matrice osseuse et impliqués dans la formation osseuse (voir section 1.1.2), des gènes impliqués dans la différenciation des ostéoblastes, ou des facteurs essentiels à la différenciation des ostéoclastes, les deux derniers groupes de gènes étant impliqués dans le remodelage osseux.

Ainsi, l'inactivation du gène codant pour le biglycane de la matrice osseuse induit une diminution de la croissance et une réduction de la masse osseuse après la naissance, résultant en une ostéoporose progressive ou ostéopénie (Xu *et al.*, 1998).

Les souris déficientes en une autre protéine de la matrice osseuse, l'ostéonectine, présentent une réduction du nombre d'ostéoblastes et d'ostéoclastes résultant en un défaut de remodelage et d'équilibre osseux et une ostéopénie prononcée (Delany *et al.*, 2000).

Les souris dont l'ostéopontine est absente sont résistantes à la perte osseuse induite par ovariectomie (Yoshitake *et al.*, 1999). Chez les souris non ovariectomisées, l'inactivation du gène de l'ostéopontine induit une augmentation de la masse osseuse (Yoshitake *et al.*, 1999). Cela s'explique par l'importance de l'interaction entre les protéines de la matrice osseuse dont l'ostéopontine fait partie, et les intégrines présentes sur la membrane des ostéoclastes qui permettent l'adhésion de ces derniers à la matrice osseuse et sa résorption.

L'inactivation du gène codant pour OPG (*osteoprotegerin*), un inhibiteur de la formation des ostéoclastes, résulte en une diminution de la densité osseuse (Bucay *et al.*, 1998) due à une activité résorptive accrue. De plus, des mutations de perte de fonction ont été identifiées dans l'homologue humain *TNFRSF11B* chez des patients atteints de la forme juvénile autosomale récessive de la maladie de Paget (Cundy *et al.*, 2002; Whyte *et al.*, 2002).

Le proto-oncogène *c-Abl* (*Abelson*) est exprimé fortement dans le cartilage des souris adultes, dans le tissu osseux des souris nouveaux-nés, et dans les ostéoblastes au niveau des sites d'ossification endochondrale foetale. Les souris *c-Abl*^{-/-} présentent un amincissement du cortex des os longs et une réduction du volume de l'os trabéculaire dus à un retard de maturation des ostéoblastes (Li *et al.*, 2000a).

L'IGF-I (*insuline growth factor*) active la prolifération ostéoblastique et la synthèse de collagène de type I *in vitro* et la formation osseuse *in vivo*. De plus, l'IGF-I diminue l'apoptose des ostéoblastes. La sur-expression dirigée d'IGF-I dans les ostéoblastes induit une augmentation de leur activité, mais pas de leur prolifération, ce qui conduit à une augmentation de la masse osseuse chez la souris (Zhao *et al.*, 2000a). Inversement, l'invalidation du gène *Irs1* (*insulin receptor substrate-1*), impliqué dans la signalisation de l'IGF-I, induit une ostéopénie sévère qui résulte d'une réduction de la prolifération et de la différenciation des ostéoblastes (Ogata *et al.*, 2000).

Les FGF (*fibroblast growth factor*) sont des régulateurs importants de la prolifération, de la fonction et de l'apoptose des ostéoblastes. Ainsi, l'invalidation du gène *Fgf-2* chez la souris diminue la formation osseuse et induit une ostéopénie (Montero *et al.*, 2000).

L'invalidation du gène *klotho* chez la souris induit plusieurs pathologies ressemblant aux celles associées au vieillissement chez les humains. Ce gène code pour une protéine membranaire et présente des transcrits alternatifs codant pour des protéines potentiellement sécrétées. Le domaine extracellulaire de la protéine présente des fortes homologies avec la beta-galactosidase. Chez la souris *klotho*^{-/-}, on observe une diminution de la formation osseuse qui excède la diminution de la résorption osseuse, résultant en une perte osseuse nette (Kuro-o M *et al.*, 1997). De plus, ce mutant présente une diminution des cellules B-lymphoïdes qui peuvent jouer un rôle dans l'ostéoclastogénèse en sécrétant RANKL ou en servant comme précurseurs des ostéoclastes (Manabe *et al.*, 2001). Ceci explique la diminution de la résorption osseuse observée chez la souris *klotho*^{-/-} qui serait due à un défaut dans le potentiel de différenciation des ostéoclastes.

L'invalidation génique de la phosphatase SHIP (*Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase*) induit une ostéopénie chez la souris résultant d'une résorption accrue qui découle d'une durée de vie prolongée des ostéoclastes activés et donc d'un nombre élevé d'ostéoclastes hyperactifs (Takeshita *et al.*, 2002) (*figure 5*). Ces ostéoclastes présentent une hyper-sensibilité au M-CSF et au RANKL *in vitro*, contiennent plusieurs noyaux, et sont plus résistants à l'apoptose. Cette apoptose implique les facteurs PI(3)K et AKT qui sont des kinases agissant en aval de Src et jouant un rôle dans la survie et la migration cellulaires, ainsi que dans

l'organisation du cytosquelette. SHIP régule négativement la signalisation via PI(3)K, ce qui suggère un rôle de SHIP dans la survie des ostéoclastes, plus particulièrement la régulation de leur mort par apoptose.

Plus récemment, un modèle d'ostéoporose associée avec l'âge a été généré par invalidation génique du gène *Sca-1* (*stem cell antigen 1*) chez la souris (Bonyadi *et al.*, 2003). Ce gène est directement impliqué dans l'auto-régénération des progéniteurs mésenchymateux d'où dérivent les ostéoblastes, et indirectement dans la régulation de la différenciation des ostéoclastes. La souris *Sca-1*^{-/-} adulte présente une diminution de la formation et de la résorption osseuses. Ainsi, la souris *Sca-1*^{-/-} montre un développement osseux précoce normal, mais une diminution progressive de la masse osseuse avec l'âge due à la diminution du potentiel auto-régénératif des progéniteurs mésenchymateux.

D'autres modèles ont été générés par ovariectomie et présentent une ostéoporose similaire à celle décrite chez les femmes ménopausées. Cette ostéoporose est causée par une carence en œstrogènes (Jilka *et al.*, 1992) qui résulte en une diminution de l'apoptose des ostéoclastes et en une résorption osseuse accrue, sans affecter l'état des ostéoblastes.

2.3) Modèles animaux de l'ostéopétrose

A l'encontre de l'ostéoporose, plusieurs modèles animaux d'ostéopétrose récessive existent, en particulier des mutants spontanés ou induits chez la souris, dont quelques un seulement impliquent des gènes dont des mutations ont été décrites chez les humains.

2.3.1) Mutants spontanés chez la souris

Quatre modèles spontanés d'ostéopétrose existent chez la souris. Ce sont: *op* (*osteopetrotic*), *oc* (*osteosclerotic*), *mi* (*microphthalmia*) et *gl* (*grey-lethal*) (*figure 5*). Trois de ces gènes ont été identifiés, et la caractérisation du gène *gl* fait l'objet de cette thèse.

Chez la souris *op*, une mutation récessive dans la région codante du gène codant pour le facteur de croissance M-CSF produit une protéine non-fonctionnelle et par conséquent un défaut au niveau de la survie et la prolifération des précurseurs ostéoclastiques (Yoshida *et al.*, 1990). En effet, le croisement de la souris *op* avec une souris surexprimant le facteur anti-apoptotique BCL-2 dans les monocytes, corrige partiellement le phénotype ostéopétrotique, confirmant l'implication de l'apoptose dans la régulation de la survie des ostéoclastes par M-CSF (Lagasse et Weissman, 1997). Le M-CSF, comme mentionné précédemment, est produit par les ostéoblastes et par conséquent une transplantation de moelle osseuse (source des précurseurs d'ostéoclastes) n'a aucun effet curatif sur la maladie (Marks,

Jr. *et al.*, 1984). Dans certains cas, une amélioration du phénotype ostéopétrotique a été observée avec l'âge (Begg et Bertoncetto, 1993), probablement due à une compensation par le facteur VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Niida *et al.*, 1999). À noter qu'aucune mutation n'a encore été reportée dans l'homologue humain de M-CSF chez des patients ostéopétrotiques.

oc est une mutation autosomale récessive létale qui affecte l'activité résorptive des ostéoclastes. Par clonage positionnel, une délétion de 1.6 kb a été identifiée dans l'homologue murin du gène humain codant pour une sous-unité (116 kD) spécifique aux ostéoclastes de la pompe à proton H⁺-ATPase (Scimeca *et al.*, 2000). De même, l'invalidation de cette sous-unité chez la souris induit un phénotype ostéopétrotique similaire (Li *et al.*, 1999). Enfin, le gène homologue humain est muté chez plusieurs patients atteints d'ostéopétrose infantile maligne (Sobacchi *et al.*, 2001). Chez cette souris, la pompe à proton est absente de la membrane plissée apicale. Bien que le défaut soit maintenant bien caractérisé comme étant intrinsèque aux ostéoclastes, les essais de correction du phénotype par transplantation de moelle n'ont pas pu confirmer cela, quoique deux souris transplantées sur vingt-neuf ont survécu jusqu'à un an et ont montré une correction du phénotype osseux (Seifert et Marks, Jr., 1987).

La souris *mi* implique une mutation de type dominant-négatif, et non récessif, dans le gène codant pour le facteur de transcription MITF qui est une protéine à domaine basique helix-loop-helix et agissant en homo- ou hétéro-dimères avec d'autres membres de cette famille (TFE3, TFEB et TFEC). Ce facteur exprimé par les ostéoclastes est essentiel à la fusion des précurseurs ostéoclastiques pour générer des cellules multinucléées (Thesingh *et al.*, 1985). Ainsi chez cette souris, on assiste à une abondance de précurseurs ostéoclastiques mononucléés et à une ostéopétrose due à un défaut dans la différenciation des ostéocalstes. Cette souris présente aussi un phénotype au niveau du pelage et des yeux puisque le facteur MITF est essentiel dans d'autres types cellulaires dont les mélanocytes et les cellules de l'épithélium pigmenté de la rétine; la souris montre un défaut de pigmentation et un pelage blanc dû à l'absence des mélanocytes au niveau de la peau, et ses yeux hypoplasiques sont non pigmentés (Hodgkinson *et al.*, 1993;Thesingh *et al.*, 1985). À noter qu'aucune mutation n'a été reportée jusqu'à maintenant dans le gène homologue humain de MITF chez des patients ostéopétrotiques. Par contre, des mutations dans *MITF* ont été décrites chez des patients atteints du syndrome de Waardenburg qui implique un défaut des mélanocytes et qui affecte le développement de l'oreille, des yeux, des cheveux et de la peau (Tassabehji *et al.*, 1994). L'homodimère MITF ou l'hétérodimère MITF/TFE (surtout TFE3) lient la boîte E présente dans les promoteurs des gènes TRAP et cathépsine K pour réguler l'activité résorptive des ostéoclastes (Luchin *et al.*, 2000;Motyckova

et al., 2001). MITF interagit aussi avec PU.1 et c-Fos et détermine la localisation sous-cellulaire de ces facteurs (Sato *et al.*, 1999). Des études récentes ont révélé l'implication de MITF dans la transduction du signal de M-CSF en induisant la phosphorylation de MITF et TFE3 via un site consensus conservé de MAPK et le recrutement du co-activateur p300 (Weilbaecher *et al.*, 2001). De plus, le facteur anti-apoptotique BCL-2, dont l'inactivation du gène cause une sévère ostéopétrose chez la souris, est aussi une cible de MITF (McGill *et al.*, 2002). La perte combinée de MITF et TFE3 cause une sévère ostéopétrose chez la souris, alors que les souris avec une délétion homozygote d'un des deux facteurs sont normales, ce qui explique la redondance de l'activité des deux facteurs (Steingrimsson *et al.*, 2002).

Le dernier mutant spontané est *gl* qui présente une ostéopétrose récessive létale, mais aussi un phénotype de couleur du poil, indiquant un rôle pour ce gène dans deux types cellulaires: ostéoclastes et mélanocytes. Ce modèle sera décrit en détails plus loin dans cette thèse puisqu'il fait son objet.

2.3.2) Mutants induits chez la souris

Plusieurs mutants induits d'ostéopétrose récessive existent grâce à l'invalidation génétique par *knock-out* de plusieurs gènes chez la souris, ce qui a contribué énormément à nos connaissances actuelles sur la différenciation et l'activité de l'ostéoclaste (*figure 5*).

Dans les premières étapes de détermination de la voie ostéoclastique, soit au niveau des précurseurs communs aux monocytes/macrophages de la lignée myéloïde, l'inactivation du facteur de transcription PU.1 entraîne une ostéopétrose sévère (létalité précoce) avec une absence d'ostéoclastes, de macrophages, sans atteinte de la lignée lymphoïde. Une transplantation de moelle restaure le phénotype et indique que le défaut est intrinsèque aux précurseurs hématopoïétiques (Tondravi *et al.*, 1997).

L'inactivation double de NF- κ B1/NF- κ B2 induit une ostéopétrose avec une réduction du nombre des pré-ostéoclastes et des macrophages. NF- κ B1 et NF- κ B2 sont impliqués dans la régulation du système immunitaire et des réponses inflammatoires, et l'inactivation simple de chacun (p50^{-/-} et p52^{-/-}) résulte en une réponse immunitaire altérée sans aucun défaut du développement osseux, suggérant des activités redondantes. Une transplantation de moelle corrige le phénotype ostéopétrotique, confirmant ainsi que le défaut est dans les précurseurs hématopoïétiques (Franzoso *et*

al., 1997; Iotsova *et al.*, 1997).

L'inactivation de c-Fos induit une ostéopétrose associée à une réduction du nombre des pré-ostéoclastes, due à un blocage dans leur voie de différenciation. Ces pré-ostéoclastes sont en aval du précurseur commun des macrophages et des ostéoclastes. Cela favorise la voie des macrophages dans la lignée myéloïde résultant en une augmentation en nombre des macrophages hématopoïétiques. Une transplantation de moelle corrige le phénotype ostéopétrotique (Grigoriadis *et al.*, 1994; Johnson *et al.*, 1992).

L'inactivation de RANK induit une ostéopétrose due à un blocage dans la différenciation des ostéoclastes, sans atteinte des macrophages (Li *et al.*, 2000b). Des mutations de gain de fonction dans l'homologue humain TNFRSF11A ont été identifiées dans une forme dominante d'un désordre osseux nommé (*familial expansile osteolysis*) qui se manifeste par une augmentation du processus de remodelage osseux, et aussi dans la forme autosomale dominante de la maladie de Paget (Hughes *et al.*, 2000; Whyte et Hughes, 2002). Bien que les mutations humaines ne représentent pas des phénocopies de la mutation nulle de souris, ce sont certainement des conséquences d'une perturbation de l'homéostasie osseuse.

L'inactivation de RANKL entraîne une ostéopétrose avec une réduction du nombre des pré-ostéoclastes et représente une phénocopie de la déficience

en RANK. Cette inactivation n'affecte pas les macrophages (Kim *et al.*, 2000).

L'inactivation de c-fms, le récepteur du M-CSF, entraîne lui aussi une ostéopétrose plus sévère que celle observée chez le mutant spontanée *op/op*, avec une réduction du nombre des précurseurs d'ostéoclastes et donc un défaut de différenciation (Dai *et al.*, 2002).

L'inactivation de c-Src induit une ostéopétrose létale avec des ostéoclastes non-fonctionnels. Les ostéoclastes *src*^{-/-} sont multinucléés, mais dépourvus de la bordure plissée apicale et sont donc incapables de résorber l'os (Amling *et al.*, 2000; Soriano *et al.*, 1991).

L'inactivation de Acp-5 (*tartrate-resistant acid phosphatase*), un marqueur des ostéoclastes, induit aussi une ostéopétrose légère qui se corrige avec l'âge et qui est causée par une réduction du nombre des ostéoclastes, sans atteinte des macrophages (Hayman *et al.*, 1996).

Un autre modèle d'ostéopétrose récessive a été généré par l'inactivation de la cathépsine K, une cystéine-protéinase exprimée fortement dans les ostéoclastes et impliquée dans leur fonction résorptive (Saftig *et al.*, 1998). C'est une ostéopétrose associée à une pycnodysostose et qui progresse avec l'âge. Ce modèle ressemble au phénotype humain de pycnodysostose qu'on

observe chez des patients portant des mutations dans la cathépsine K (Gelb *et al.*, 1996). Chez la souris comme chez l'humain, les os qui sont plus rapidement remodelés sont plus sévèrement affectés, surtout les os longs des membres qui sont soumis fréquemment à des efforts physiques.

Les deux derniers mutants induits par *knock-out* chez la souris et dont la fonction s'est avérée essentielle dans l'activité résorptive de l'ostéoclaste, en particulier le processus d'acidification, sont la sous-unité $\alpha 3$ de la pompe à proton (V)-ATPase (Li *et al.*, 1999) et le canal de chlore ClC-7 (Kornak *et al.*, 2001). L'inactivation de la sous-unité $\alpha 3$ de la pompe à proton entraîne les mêmes phénotypes que ceux observés chez le mutant ostéopérotique spontané *oc/oc* causé par une mutation dans le même gène (voir section 2.3.1). Dans le cas du ClC-7, son inactivation induit une ostéopétrose récessive sévère létale et une dégénérescence de la rétine. Les ostéoclastes *Clcn7^{-/-}* sont présents en nombre normal avec une bordure plissée, mais ne sont pas capables de résorber l'os, indiquant un défaut dans la fonction et non dans la différenciation. De plus, chez deux patients atteints de l'ostéopétrose autosomale récessive dont un exprimant le phénotype de dégénérescence de la rétine (Kornak *et al.*, 2001), des mutations dans le gène humain *CLCN7* ont été identifiés et associés directement à ces phénotypes (Cleiren *et al.*, 2001; Kornak *et al.*, 2001).

Récemment, l'invalidation du gène codant pour DAP12, une protéine activatrice du signal d'un immunorécepteur et identifiée initialement dans le système immunitaire (cellules myéloïdes et NK), induit une ostéopétrose bénigne, une hypomyélinisation thalamique associée à une dégénérescence synaptique (Kaifu *et al.*, 2003). Le défaut cellulaire primaire correspond à un blocage de différenciation des ostéoclastes et des oligodendrocytes: les cellules restent donc à un stade immature. Ce modèle de souris ressemble au syndrome humain de Nasu-Hkola caractérisé par des fractures osseuses et des symptômes psychiques similaires à la schizophrénie et dans lequel des délétions dans le gène *DAP12* humain ont été associées à la maladie (Paloneva *et al.*, 2000). C'est un modèle intéressant confirmant l'association étroite entre le système nerveux central et la régulation de la masse osseuse.

Bien que tous ces modèles induits présentent un phénotype ostéopétrotique, de masse osseuse accrue ou de remodelage osseux, seulement des mutations dans les gènes codant pour RANK, cathépsine K, CIC-7, H⁺-ATPase et DAP12 ont été décrites et associées à des phénotypes osseux chez l'humain. Plus particulièrement, CIC-7 et H⁺-ATPase qui présentent des similarités profondes avec l'ostéopétrose autosomale récessive maligne.

3)L'ostéopétrose humaine

L'ostéopétrose fut décrite pour la première fois en 1904 par Alberst-Schönberg suite à l'examen clinique et radiologique d'un patient adulte présentant une sclérose osseuse généralisée et des fractures multiples (Cheow *et al.*, 2001). On sait maintenant qu'elle comprend un large spectre de désordres squelettiques: une forme infantile maligne sévère à transmission autosomale récessive (MIM: 259700); une forme intermédiaire bénigne à transmission autosomale récessive (MIM: 259710); et une forme adulte bénigne à transmission autosomale dominante (MIM: 166600).

3.1)L'ostéopétrose récessive maligne

Cette forme représente la plus rare et la plus sévère de toutes les formes d'ostéopétrose (1/100 000 à 1/500 000 naissances). Elle se manifeste souvent dans la première décennie après la naissance et est souvent mortelle avant l'âge de 10 ans (Gerritsen *et al.*, 1994b). Les manifestations cliniques résultent surtout de la réduction de la moelle osseuse et de la compression des nerfs et des organes par la densité osseuse accrue, et ces signes sont: surdité, troubles visuels, hépatosplénomégalie, anémie, thrombocytopénie, infections fréquentes et une ostéosclérose diffuse de tous les os. Le seul traitement disponible et efficace est la transplantation de moelle osseuse, cependant la rareté de donneurs compatibles et les effets secondaires obligent de restreindre la greffe aux cas les plus sévères (Cheow *et al.*, 2001;Gerritsen *et al.*, 1994a), d'où l'importance d'identifier le défaut

génétique afin de prévenir la maladie par le diagnostic prénatal.

Des défauts génétiques dans quatre gènes différents ont été associés à cette forme d'ostéopétrose, dont *GL* qui fait l'objet de cette thèse et qui sera décrit plus loin. Les trois autres sont: la sous unité a3 de la pompe à proton vacuolaire (V)-ATPase codée par le gène *TCIRG1* localisé en 11q13 et qui a été trouvé muté chez 50% des patients atteints de l'ostéopétrose infantile maligne (ARO) (Sobacchi *et al.*, 2001); le canal de chlore codé par *CLCN7* localisé en 16p13.3 et qui a été trouvé muté chez deux patients (ARO) (Cleiren *et al.*, 2001; Kornak *et al.*, 2001); le dernier gène *CA2* code pour l'Anhydrase Carbonique II (CAII) localisé en 8q22 et dans lequel des mutations ont été associées à une forme d'ostéopétrose particulière (MIM: 259730) distincte de celle observée dans *TCIRG1* et *CLCN7*. En fait, les mutations dans *CA2* entraînent une ostéopétrose récessive qui se caractérise par des symptômes supplémentaires, soient une calcification cérébrale et une acidose tubulaire rénale (Sly *et al.*, 1983). Cependant, les souris déficientes en CAII présentent uniquement le phénotype rénal sans aucune ostéopétrose évidente même chez les souris âgées (Lewis *et al.*, 1988).

Tous ces gènes affectés, incluant *GL*, présentent en commun un rôle essentiel dans l'activité résorptive des ostéoclastes, en particulier le processus d'acidification et dans l'équilibre ionique.

3.2) L'ostéopétrose récessive intermédiaire

Cette forme d'ostéopétrose est diagnostiquée chez les enfants de moins de 10 ans. Elle est moins sévère que l'ARO, mais plus sévère que la forme dominante. C'est, quand même, une forme bénigne qui n'est pas létale et qui n'affecte pas l'espérance de vie. Les symptômes cliniques sont: ostéosclérose diffuse, hépatosplénomégalie et susceptibilité aux fractures. Récemment, des mutations identifiées dans le gène *CLCN7* ont été associées avec cette forme d'ostéopétrose (Campos-Xavier *et al.*, 2003).

3.3) L'ostéopétrose dominante bénigne

Cette forme bénigne d'ostéopétrose est la plus fréquente. Elle se manifeste chez les adultes qui sont souvent asymptomatiques et diagnostiqués par examens radiographiques approfondis. Cette forme n'affecte aucunement l'espérance de vie. Deux types d'ostéopétrose dominante existent: le type I (ADOI) qui se caractérise par une ostéosclérose diffuse et généralisée qui affecte le crâne (Bollerslev et Andersen, Jr., 1988); et le type II (ADOII), qui est la forme originale décrite par Albers-Schönberg et qui est la plus fréquente (5.5/100 000 naissances) (Benichou *et al.*, 2000). Les manifestations cliniques de l'ADOII sont: fractures des os longs, plasies des nerfs crâniens, ostéoarthrite de la hanche et ostéomyélite de la mandibule (Cleiren *et al.*, 2001). L'ADOII est associée à des mutations dans le gène *CLCN7* codant pour le canal de chlore (Cleiren *et al.*, 2001).

4)La souris grey-lethal

Un autre mutant spontané d'ostéopétrose est la souris grey-lethal (*gl*) qui fait l'objet de cette thèse. Cette souris représente le modèle animal idéal pour l'étude de l'ostéopétrose récessive, en particulier l'ostéopétrose infantile maligne, puisqu'elle présente des phénotypes très proches de ceux observés dans la maladie infantile humaine.

4.1)Origine et maintien de la mutation *gl*

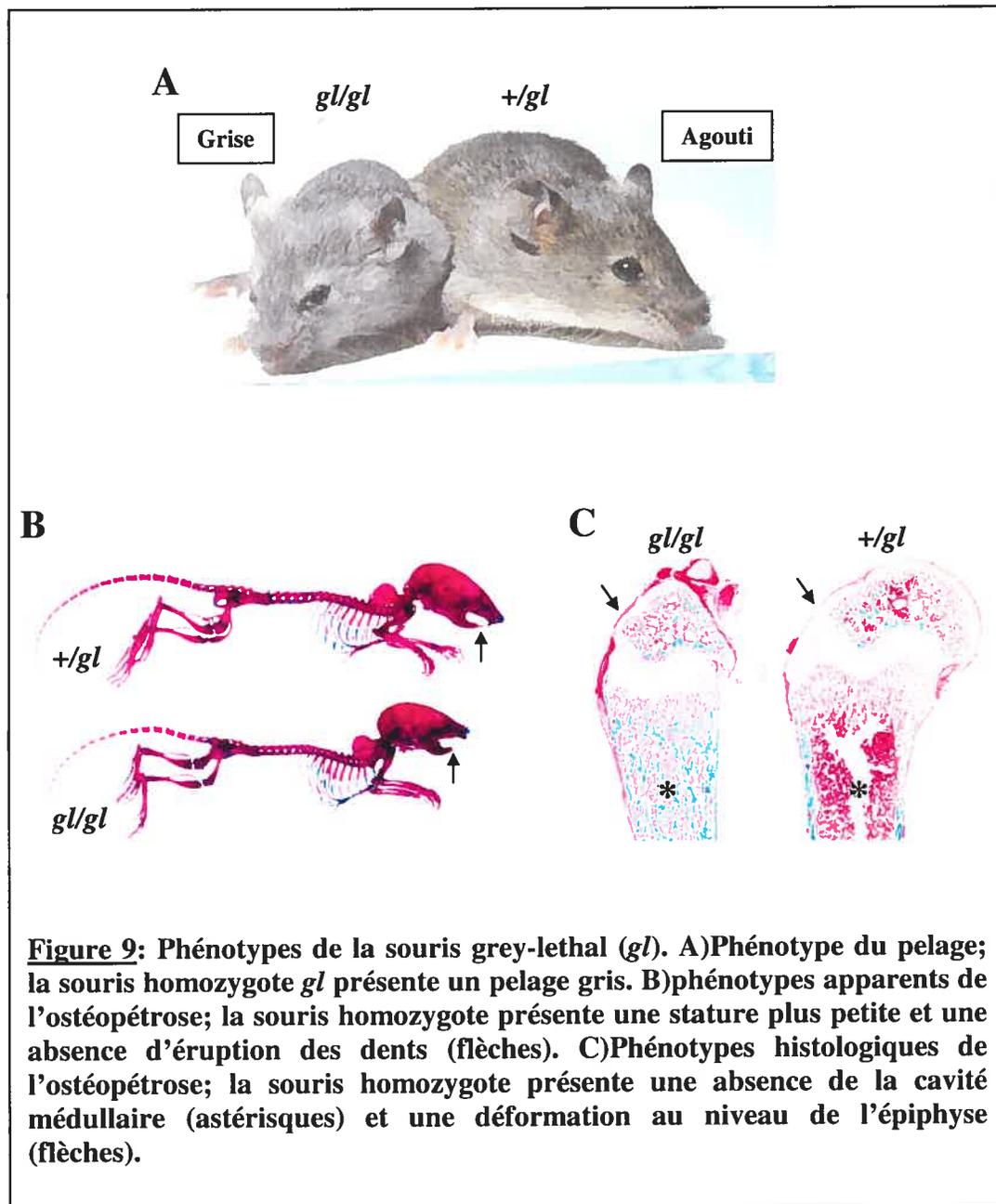
La souris grey-lethal fut décrite pour la première fois par Grüneberg en 1935 (Grüneberg, 1935;Grüneberg, 1936;Grüneberg, 1938). C'est un mutant spontané qui est apparu dans une colonie de souris maintenues pour l'allèle "*extreme dilution*" (*c^e*) du locus albino, et qui a été identifiée par la couleur grise de son pelage comparé aux souris sauvages qui sont agouti (Lyon et Searle, 1989). Le maintien de la mutation se fait à l'état hétérozygote et de plus, la mutation récessive viable downless (*dl*) a été introduite pour générer une souche *GL/Le dl^l +/+ gl*, permettant ainsi de suivre la transmission de l'allèle *gl* dans la progéniture. Cette lignée a par la suite été croisée avec une souris C57BL/6J et maintenue à l'état hétérozygote par un croisement frère/soeur (*intercross*).

4.2)Phénotypes de la souris *gl*

La souris *gl* se caractérise par deux phénotypes majeurs: soient un phénotype squelettique et un phénotype de couleur du pelage (*figure 9A*).

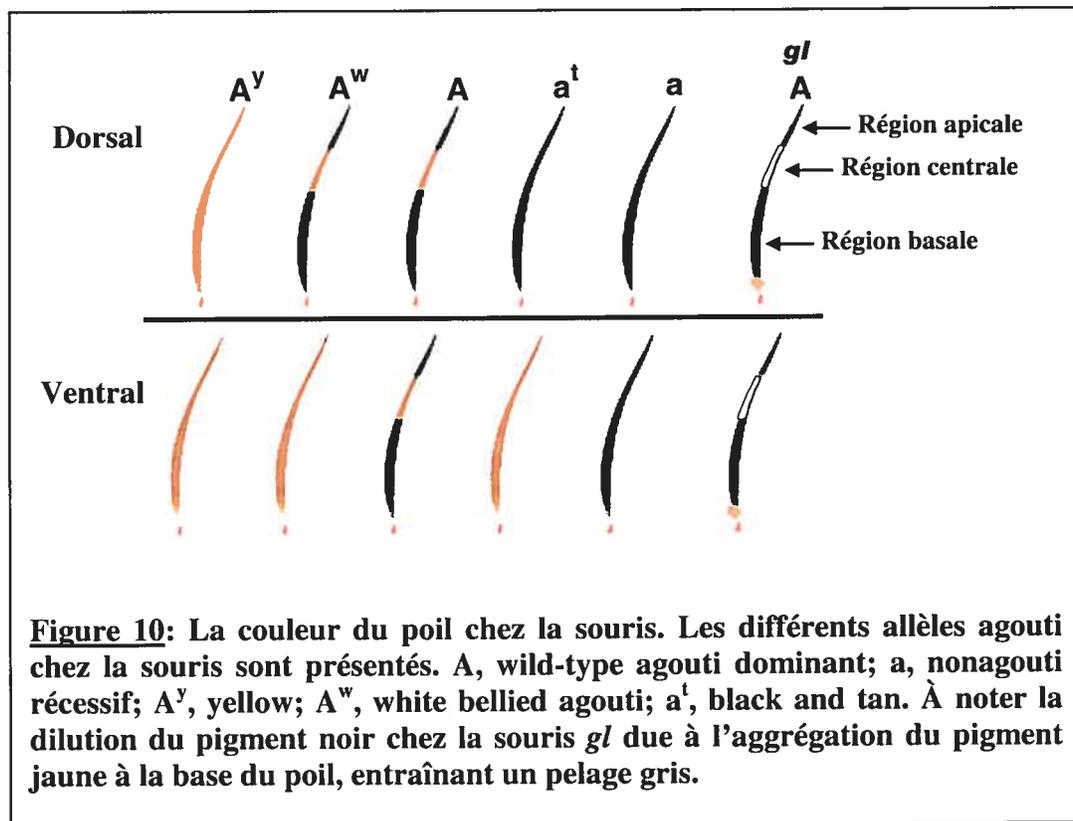
4.2.1) Phénotype squelettique

La souris *gl* présente une ostéopétrose autosomale récessive très sévère causant une mort précoce à environ trois semaines d'âge. Cette ostéopétrose se manifeste, comme chez tous les mutants ostéopérotiques murins, par une absence d'éruption des dents et par un retard de croissance (Grüneberg, 1938; Hollinshead *et al.*, 1975) (*figure 9B*). Des coupes histologiques effectuées sur les os longs de la souris *gl* démontrent clairement une réduction majeure de la cavité médullaire, résultant en une quasi-absence de la moelle osseuse; on peut aussi observer une densité osseuse accrue qui affecte l'architecture et la forme de l'os, en particulier l'épiphyse et la plaque de croissance (*figure 9C*). La cause définitive de la mort n'a pas été établie, bien qu'une susceptibilité accrue aux infections, une compression des organes vitaux (poumons et nerfs par exemple), ainsi qu'une difficulté à se nourrir pourraient en être la cause. Cependant, en maintenant les souris *gl/gl* dans un environnement exempt de pathogènes (animalerie SPF) et en leur fournissant une diète liquide, nous n'avons observé aucune prolongation de la durée de vie, excluant ainsi ces deux possibilités. À noter que la souris *gl/gl* ne présente pas de splénomégalie due à une hématopoïèse extramedullaire; par contre, une baisse de certaines populations hématopoïétiques (cellules B par exemple) a été remarquée mais qui pourrait s'expliquer par un effet secondaire dû à la réduction de la moelle osseuse.



4.2.2) Phénotype de couleur du pelage

Un autre phénotype majeur chez la souris *gl* est la couleur grise de son pelage et qui est unique à ce modèle murin d'ostéopétrose (*figure 9A*). En effet, la souris homozygote *gl/gl* se distingue par une couleur grise du poil différente des souris sauvages ou hétérozygotes qui sont agouti. Ce phénotype est très utile pour l'identification rapide de la souris homozygote dans la progéniture. Cependant, puisque la couleur grise implique le pigment jaune, ce phénotype ne peut se manifester que si la souris est maintenue sur un fond génétique agouti (AA ou Aa; A, agouti dominant; a, nonagouti récessif); la souris homozygote *gl/gl* sera noire sur un fond génétique C57BL/6J (aa, noir).



Chez les mammifères, les cellules pigmentaires sont originaires de deux lignées cellulaires différentes: les mélanocytes de la peau, des follicules pileux et de la choroïde et l'iris de l'oeil sont originaires de la crête neurale et migrent jusqu'à leur destination finale, tandis que l'épithélium pigmenté de la rétine est directement issu du cerveau antérieur en développement, sans phase migratoire. La couleur du poil dépend de deux pigments principaux produits par les mélanocytes: la pheomélanine correspond au pigment jaune et rouge, et l'eumélanine correspond au pigment noir et brun. La synthèse biochimique de ces deux pigments est assurée par l'activité d'une enzyme essentielle qui est la Tyrosinase. En effet, le poil agouti est une structure striée présentant trois zones à pigmentation variable (*figure 10*) et ce sont les différentes combinaisons de ces deux pigments qui sont à l'origine des plusieurs couleurs du pelage observées chez les souris ou chez les mammifères en général (Barsh, 1996). Ainsi, une souris agouti (AA ou Aa) présente le pigment noir (eumélanine) dans la région apicale (pointe) et basale du poil, et le pigment jaune (pheomélanine) dans la région centrale, résultant en un pelage agouti. Par contre, une souris noire (aa) ne présente aucun pigment jaune.

4.3)Caractérisation cellulaire

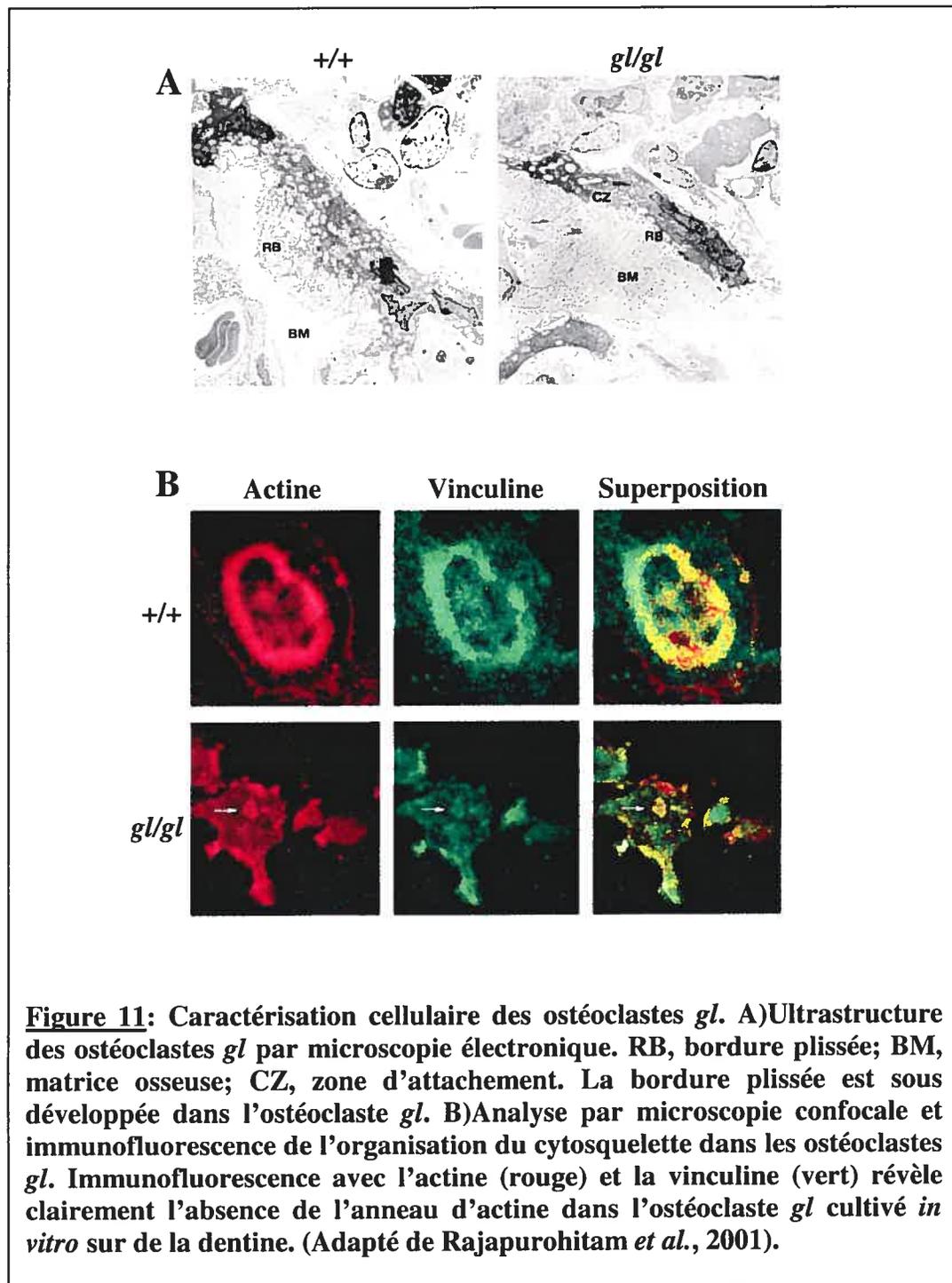
Afin de mieux comprendre les phénotypes observés chez la souris *gl*, autant au niveau osseux que du pelage, des études de caractérisation cellulaire ont été effectuées et ont permis de mieux définir les caractéristiques des ostéoclastes et des mélanocytes chez la souris *gl*.

4.3.1)Ostéoclastes

La preuve que l'ostéopétrose observée chez la souris *gl* est associée à un défaut intrinsèque aux ostéoclastes est venue des essais de complémentation par transplantation de moelle osseuse ou de cellules de la rate chez ce modèle de souris (Walker, 1975a). Walker a démontré que la transplantation de cellules de la moelle osseuse ou de la rate sont capables de corriger le phénotype ostéopétrotique chez les souris *gl* irradiées. Cela indique que les cellules impliquées dans ce phénotype sont d'origine hématopoïétique, présumément des précurseurs d'ostéoclastes et excluant ainsi les ostéoblastes. De même, le transfert des cellules de la rate d'une souris *gl* transmet l'ostéopétrose à une souris réceptrice sauvage irradiée (Walker, 1975b).

Pour analyser le défaut cellulaire des ostéoclastes chez la souris *gl*, notre laboratoire a caractérisé au niveau cellulaire les ostéoclastes *gl*. Ainsi, par une coloration TRAP spécifique aux ostéoclastes, notre laboratoire a démontré que la souris *gl* présente des ostéoclastes en nombre plus élevé au

niveau de l'os, mais ils ne sont pas capables de résorber la matrice osseuse, comme démontré *in vitro* par "pit assay" (Rajapurohitam *et al.*, 2001). Cela indique que l'ostéopétrose associée à la souris *gl* est une ostéopétrose fonctionnelle, c'est à dire que ce n'est pas la différenciation des ostéoclastes qui semble affectée mais plutôt leur fonction de résorption. De plus, la souris *gl* produit plus d'ostéoclastes, indiquant que les signaux de prolifération et de différenciation ne sont pas déficitaires non plus. Pour mieux déterminer l'état des ostéoclastes *gl* et leur niveau de différenciation, des analyses de leur ultrastructure ont été effectuées par microscopie électronique (*figure 11A*). Les ostéoclastes *gl* sont multinucléés et sont présents au niveau de l'os auquel ils se fixent par le biais de leurs zones d'attachement. Cependant, on peut remarquer le faible développement de la bordure plissée apicale chez l'ostéoclaste *gl*, expliquant ainsi l'absence de résorption et l'ostéopétrose chez la souris *gl*. De plus, ces observations indiquent que la migration et l'attachement des ostéoclastes ne sont pas affectés, excluant ainsi l'implication des facteurs comme c-Src et $\alpha v \beta 3$ dans ces défauts et impliquant Gl dans un mécanisme en aval. En effet, les facteurs c-Src, TRAF6, Cathépsine K et le complexe (V)-ATPase sont normalement exprimés dans les ostéoclastes *gl* générés en culture (OCL: Osteoclast Like Cell). Une autre observation marquante est la désorganisation du cytosquelette dans les ostéoclastes *gl* qui se manifeste par une absence de la formation de l'anneau d'actine résultant en une activité résorptive altérée (Rajapurohitam *et al.*, 2001) (*figure 11B*).



4.3.2) Poils et cellules pigmentaires

Les analyses microscopiques effectuées par Grüneberg en 1935 (Grüneberg *et al.*, 1935) sur les poils et la synthèse du pigment par les mélanocytes chez la souris *gl*, ont démontré que le pigment jaune (pheomélanine) et le pigment noir (eumélanine) sont synthétisés chez la souris *gl*. Cependant, la distribution du pigment jaune est altérée dans le poil *gl*. En effet, le pigment jaune reste pris en agrégats au niveau de la base du poil, comme c'est le cas pour d'autres mutants de la souris de couleur du pelage (*dilute*, *leaden* et *ashen*) qui sont tous dans une même voie de signalisation.

Ces mutants impliquent un défaut au niveau des mélanosomes qui sont les organelles responsables du transport du pigment dans les mélanocytes (Provance *et al.*, 2002). *Dilute* implique la myosin-Va (vesicle transport motor) et est muté chez les patients atteints du syndrome de Griscelli, et présente aussi un phénotype neurologique (Mercer *et al.*, 1991); *leaden* implique *Mlph* (Melanophilin) qui est un effecteur des protéines de la famille des Rab et sert à cibler la myosin-Va aux mélanosomes (Matesic *et al.*, 2001); *ashen* implique la *Rab27a*, une Rab GTPase de la famille des p21 Ras et présente un défaut au niveau des plaquettes sanguines (hémorragies) en plus du phénotype de pelage (Wilson *et al.*, 2000). Ces hémorragies sont dues à une coagulation plus lente (Swank *et al.*, 1998), ce qui n'est pas le cas pour la souris *gl* où on n'observe aucun défaut de coagulation.

Les mélanocytes *gl* sont capables de produire les deux pigments, jaune et noir, mais ne sont pas capables de transporter le pigment jaune à sa destination finale. On peut donc observer, chez une souris *gl* sur un fond génétique agouti (AA ou Aa), une absence du pigment jaune dans la région centrale du poil, entraînant la formation d'une région centrale dépourvue de pigment et par conséquent une dilution de la couleur noire du poil résultant en un pelage gris chez la souris *gl* (figure 10).

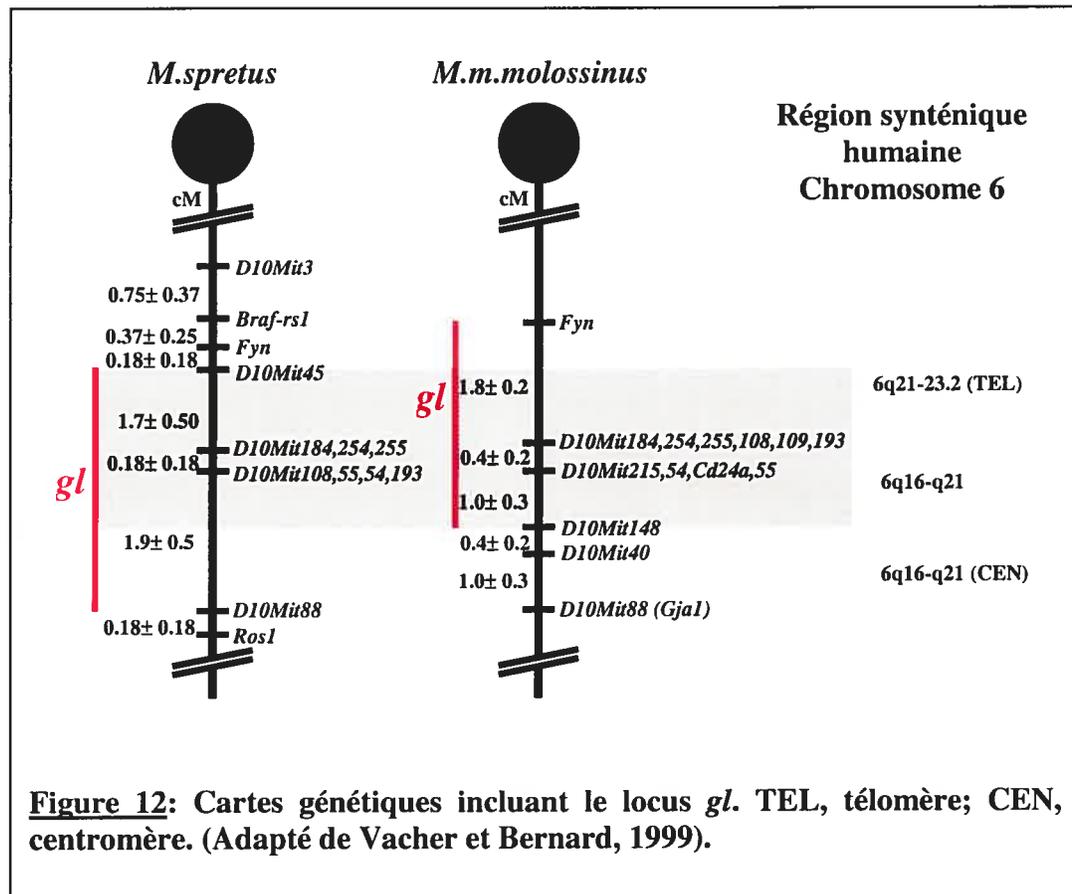
4.4) Localisation génétique de la mutation grey-lethal

Le gène *gl* fut localisé sur le chromosome 10 de la souris par une étude de ségrégation grâce aux croisements (intercross) des souris $GL/Le\ dl^J\ +/+ \ gl$ (Lane, 1971). La première localisation génétique établissait le locus dans la région proximale, à environ 29 cM du centromère et à proximité du locus *dl* (figure 12).

4.4.1) Croisements de souris

Afin de raffiner la localisation du locus *gl*, deux nouveaux croisements en retour entre la souris *gl* hétérozygote ($GL/Le\ dl^J\ +/+ \ gl$) et deux différentes souches de souris sauvages (*Mus spretus* et *Mus musculus molossinus*) ont été générés dans notre laboratoire (Vacher et Bernard, 1999). Les progénitures de ces croisements ont été génotypés pour l'identification des événements de recombinaison avec des marqueurs polymorphiques intra- ou inter-géniques. Ceci a permis d'établir deux cartes génétiques dont la

combinaison établissait une région candidate de 2 cM pour la localisation du locus *gl*, entre le gène *Fyn* et le marqueur microsatellite *D10Mit148* (figure 12). Les données génétiques ont permis d'exclure quatre gènes candidats cartographiés dans la région (*Braf-rs1*, *Fyn*, *Ros1* et *Gja1*). De plus, le génotype de la région incluant le locus *gl* a permis d'établir que cette région du chromosome 10 est une région congénique issue d'un fond génétique identique à 129/SvEms, ce qui a permis de délimiter la région candidate pour le locus *gl*. Ainsi, la région du locus *gl* correspond à 129/SvEms (région congénique), alors que le reste du génome correspond à C57BL/6J (Vacher et Bernard, 1999).

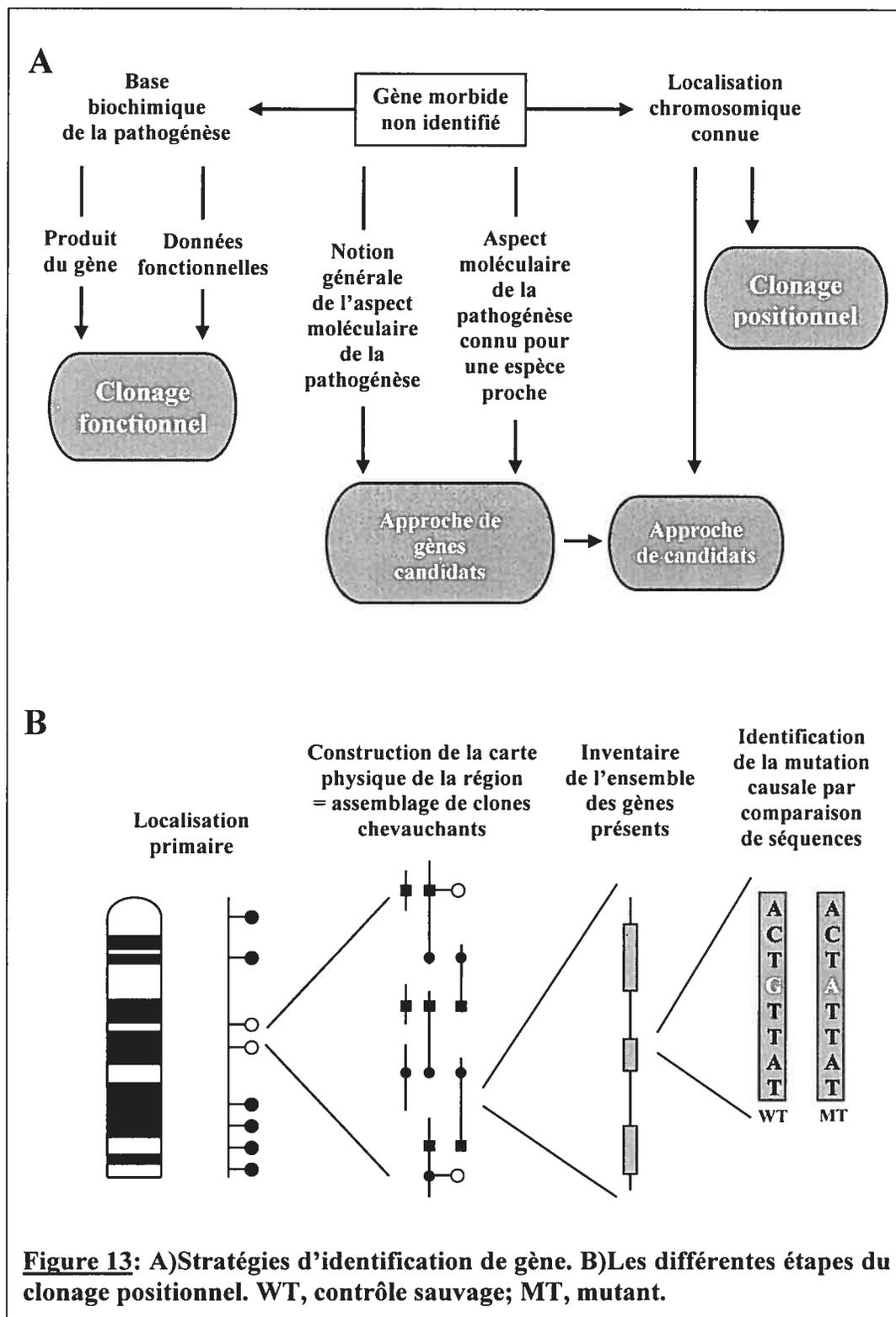


Enfin, cette région du chromosome 10 de la souris est bien conservée chez l'humain où elle correspond à la région de syntenie 6q21. Cette conservation est supportée par le nombre, l'ordre et l'identité des gènes contenus dans cette région, entre les deux espèces. Cependant, l'orientation centromérique/télomérique de cette région de souris est inversée chez l'humain avec le même ordre des gènes (*figure 12*).

4.4.2) Clonage positionnel

L'objectif principal de mon projet de doctorat a été d'identifier le gène *gl*. Puisque la localisation du gène fut déjà établie sur le chromosome 10 de la souris et qu'aucun gène cartographié dans cette région fut associé avec l'ostéopétrose, le clonage positionnel fut choisi comme approche moléculaire pour réaliser ce projet (*figure 13A*).

Le clonage positionnel consiste à identifier un gène d'intérêt à partir de la seule connaissance de sa localisation chromosomique. Cette stratégie est utilisée lorsqu'il n'existe aucun gène candidat évident ou aucun défaut biochimique spécifique. Elle comprend une localisation primaire, faite généralement par une analyse de liaison classique, puis une cartographie fine de la région d'intérêt permettant de réduire progressivement l'intervalle critique contenant le gène et d'identifier un ensemble de clones génomiques chevauchant et couvrant la région. La caractérisation détaillée de cette région permettra ensuite de mettre en évidence les séquences



codantes contenues dans cette région et enfin d'identifier le gène responsable du caractère étudié (*figure 13B*).

Etant donné qu'une approche de clonage positionnel pure est lourde et longue à mettre en œuvre, elle est souvent associée à une approche de cartographie comparée et de gènes candidats, surtout aujourd'hui où le génome de la souris et celui de l'humain sont presque complètement séquencés, et que plusieurs des séquences transcrites sont identifiées et mieux définies. Pour ajouter à cela, l'application de la transgénèse chez la souris a énormément contribué à l'identification des gènes mutés, comme vous le verrez dans cette thèse. Cependant, la cartographie comparée présente des limites quant à l'identification et la conservation de certains transcrits entre les deux espèces, ce qui nécessitera alors le recours au clonage positionnel comme la seule option. Dans cette situation, la disponibilité des séquences génomiques aura un impact majeur sur le nombre des marqueurs utilisés afin de délimiter la région d'intérêt au minimum possible.

CHAPITRE II

ARTICLE 1

SOMMAIRE

L'objectif principal de mon projet de doctorat a été d'identifier le gène *gl* et de le caractériser. Le gène *gl* étant localisé sur le chromosome 10, donc l'approche moléculaire utilisée a été le clonage positionnel. Une étape majeure dans la réalisation de ce projet a consisté à établir la carte génétique et la carte physique et transcriptionnelle de la région où est localisé le gène *gl*.

Afin de délimiter la région du locus *gl*, deux croisements de souris générés dans le laboratoire ont permis d'établir une carte génétique qui localise le locus *gl* dans un intervalle génétique inférieur à 2 cM entre le gène *Fyn* et le marqueur microsatellite *D10Mit148* (Vacher et Bernard, 1999).

Le présent article décrit la construction de la carte physique de cet intervalle génétique suite au criblage de cinq banques de chromosomes artificiels de levure (YACs) et à l'isolement de 103 clones cartographiés dans la région d'intérêt. Parmi ces clones, quarante-deux furent caractérisés par séquençage de leurs extrémités permettant ainsi de générer 24 nouveaux marqueurs spécifiques, mais surtout de générer un contig d'environ 8.5 Mb couvrant la totalité de l'intervalle génétique incluant le locus *gl*.

Par la suite, la carte transcriptionnelle de la région candidate fut établie en

utilisant les données informatiques tant chez la souris que chez l'humain. Ceci a permis d'identifier les gènes et les ESTs localisés génétiquement dans la région candidate chez la souris ou par FISH dans la région synténique humaine en 6q16-q21. Des sondes spécifiques dérivées de la souris ou des sondes hétérologues humaines ont été mises au point et ont permis de localiser et d'ordonner physiquement 15 nouveaux gènes de souris sur la carte physique dans la région candidate, ainsi que dans les régions flanquantes. Cette carte transcriptionnelle démontre clairement la forte conservation de la région proximale du chromosome 10 de souris avec la région 6q16-q21 humaine, autant dans l'ordre que dans le contenu en gènes avec, cependant, une orientation inversée par rapport au centromère.

Les résultats présentés dans cet article fournissent des ressources essentielles à l'isolement du locus *gl* associé à l'ostéopétrose récessive, mais aussi identifient de nouveaux loci pouvant être associés à d'autres anomalies génétiques localisés sur le chromosome 6q humain.

Contribution à l'article

Tableau 1, Figures 1 et 3: préparation et résultats

**PHYSICAL AND TRANSCRIPTIONAL MAP OF THE MOUSE
CHROMOSOME 10 PROXIMAL REGION SYNTENIC TO HUMAN
6q16-q21**

NADER CHALHOUB, NADIA BENACHENHOU, JEAN VACHER

**Institut de recherches cliniques de Montréal, Faculté de Médecine de
l'Université de Montréal, 110 avenue des Pins Ouest, Montréal, Québec,
Canada H2W 1R7.**

***Running title:* Mouse Chr 10 physical and transcriptional map**

Correspondence to: Jean Vacher

e-mail: vacherj@ircm.qc.ca

The original publication is available at <http://www.springerlink.com/>

Received: 12 June 2001/Accepted: 14 August 2001

Mammalian Genome. Dec 2001; 12(12): 887-892.

DOI: 10.1007/s00335-001-1014-5

ABSTRACT

Toward the isolation of the grey-lethal (*gl*) gene, we have genetically localized this locus on mouse Chromosome (Chr) 10 between the *Fyn* gene and the *D10Mit148* microsatellite marker. Here, we have screened five yeast artificial chromosome (YAC) libraries and isolated more than 100 YAC clones mapping to this region. Forty-two clones were characterized and assembled in an ~8.5 megabases (Mb) contig showing high linkage conservation with the human 6q16-q21 interval. During this study, 24 specific novel sequence-tagged sites (STSs) were derived from YAC insert ends, and 15 mouse genes were precisely mapped to the contig. The physical and transcriptional map presented here will provide novel resources to isolate the *gl* locus associated with osteopetrosis, and will also provide candidate loci for other defects mapped on human Chr 6q.

INTRODUCTION

The generation of a high-resolution physical and transcript map of a specific genomic region is essential toward the localization, isolation, and characterization of genes, especially those involved in the development of specific diseases.

Complementary to genetic maps, physical maps are based on the establishment of genomic contigs of cloned DNA, usually in yeast artificial chromosomes (YACs) or bacterial artificial chromosomes (BACs). However, low marker density can be problematic in the establishment of these maps. This was the case for the mouse Chr 10 proximal region homologous to the human 6q16-q21 interval, implicating underrepresentation of simple sequence length polymorphism (SSLP) markers and requiring a considerable effort to characterize these regions of the genome. Approximately one-third of the mouse Chr 10 proximal region is homologous to a large portion of the long arm of human Chr 6. Eighteen genes spanning this region were reported to have human homologues that map to human 6q21-q25 region on Chr 6 (2000 Chr committee reports for the mouse genome; <http://www.informatics.jax.org/ccr/searches/index.cgi>). These include genes as *Fyn*, *Cd24a*, *Blimp1*, *Aim1*, *Gja1*, *Ros1*, *Grik2*, *Col10a1*, *Lama2*, *Lama4*, *Macs* and others involved in genomic rearrangements described in various transformed cells. For example,

abnormalities of the long arm of human Chr 6 (6q) involving the chromosomal region 6q16-q27 have been reported in variety of hematological malignancies and solid tumors (Menasce et al. 1994; Sherratt et al. 1997). Furthermore, deletion of the 6q16-q21 region was shown to be involved in human lymphoid malignancies (acute lymphoblastic leukemia, ALL) (Jackson et al. 2000), suggesting the presence of tumor suppressor genes. This region of mouse Chr 10 was also reported to include the osteopetrotic *gl* locus (Vacher and Bernard 1999). Since only one specific mouse gene (*oc* = V-ATPase) (Scimeca et al. 2000) has been linked to human infantile malignant osteopetrosis (Kornak et al. 2000; Frattini et al. 2000), the study of additional animal models for the disease will likely provide important molecular insights by identifying other affected genes. Similarly, the mouse kidney disease (*kd*) gene, which is responsible for a pathological phenotype similar to the human disease, was also localized within this region (Dell et al. 2000).

Two large, previously described human contigs, WC6.13 and WC6.14, from the GDB database were reported to encompass the human 6q16-q21 region, with one genomic gap that remains uncompleted. The mouse physical and transcript map presented here is complementary to the existing human maps and also gives coverage and gene content of areas that have not been characterized in human physical maps. The precise localization of the genes mapped within this map will allow evaluation of these genes as candidate

tumor suppressor genes in an animal model or, potentially, in patients. Moreover, by providing precise transcript localization, our transcript map will allow exclusion of some potential candidate genes for these diseases. The mouse physical and transcript map presented here extends our knowledge of the conserved linkage between the mouse Chr 10 proximal region and human 6q16-q21 interval. The resulting map covers ~8.5 Mb of genomic DNA and contains 53 markers, including 15 additional, precisely mapped mouse genes with five novel murine genes never before identified.

MATERIAL AND METHODS

Molecular probes. All 53 PCR markers, including microsatellites (Research Genetics, Huntsville, Ala.), genes, ESTs, and STSs that were used for the present study are summarized in Fig. 1. Twenty-four of these were developed from YAC insert ends and 15 from genes and ESTs (Table 1). We used the following microsatellite markers for the initial screening: *D10MIT 109, 193, 184, 108, 215, 55, 148, 38*. These microsatellite markers were reported to define the *gl* locus interval (Vacher and Bernard 1999). Other microsatellite markers (*D10MIT 54, 107, 254, 255, 216*) were also used on YAC clones based on their localization within the *gl* locus interval. Polymerase Chain Reaction (PCR) conditions for the above microsatellite markers have been previously described (Vacher and Bernard 1999).

YAC library screening. Mouse YAC libraries prepared at Princeton University (Burke et al. 1991; Rossi et al. 1992) and libraries available at the GÉNÉTHON, which consists of libraries prepared at St. Mary's college (Chartier et al. 1992), the Imperial Cancer Research Fund (Larin et al. 1991 and 1993), and MIT (Kusumi et al. 1993; Haldi et al. 1996), were screened by PCR. Amplification reaction was performed in a 20- μ l volume of 10 mM Tris-hydroxychloride, pH 8.3, 50 mM KCl, and MgCl₂, as indicated in Table 1. Each reaction contained 100-200 ng DNA, 0.5 μ M of each primer, 0.2 mM dNTP, and 1U Taq polymerase (GIBCO-BRL).

Standard thermal cycler conditions were 94°C, 5 min, and 30X (94°C, 1 min ; 55°C, 1 min ; 72°C, 2 min), with variable annealing temperatures (Table 1). PCR reactions were analysed by gel electrophoresis through 10% acrylamide, and specific products detected by ethidium bromide staining.

Size determination of YAC clones. High-molecular-weight yeast DNA of the YAC clones were prepared in agarose plugs as previously described (Ragoussis 1996). Electrophoresis was performed in 1% agarose gels, 0.5X TBE for 26 hrs at 14°C in a contour-clamped homogeneous electric field (CHEF-DRIII, Bio-Rad) with a constant 60-s pulse time. The gel was stained with ethidium bromide, depurinated in 0.25 M HCl, and transferred as described (Sambrook et al. 1989). YACs were revealed by hybridization to ³²P-labeled 2.7 and 1.7 kb pBR322 DNA probes corresponding to the left and right vector arms respectively, and with yeast chromosomes prepared from *Saccharomyces cerevisiae* strain YPH 149 (Gerring et al. 1991) as size markers.

Isolation of YAC insert ends. YAC insert ends were isolated by vectorette PCR as previously described (Riley et al., 1990). Amplification products from YAC ends were directly sequenced and analysed through the BLAST server at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) and the repeat masker server (<http://repeatmasker.genome.washington.edu>). Single-copy sequences were

used to design oligonucleotide primer pairs for STS-content mapping by PCR under conditions described above. Each new STS marker was tested first on human/mouse Chr 10-specific somatic cell hybrid (Sabile et al. 1997) to exclude chimeric clones, and subsequently used for additional rounds of screening in a bidirectional chromosome walk.

Mapping of transcripts. Sequences of human cDNAs mapping to 6q16-q21 region were obtained by BLAST searches through the Sanger center (<http://www.sanger.ac.uk>) and the Whitehead institute (<http://www.genome.wi.mit.edu>) servers, and were aligned against the Mouse ESTs database. ESTs showing high degree of conservation were selected as mouse homologs and their sequences used to design PCR primer pairs. Specific PCR products were then mapped on our YAC contig and assigned a precise clone address and location.

RESULTS AND DISCUSSION

Construction of the YAC contig. The initial goal in this work was the generation of a contig spanning the osteopetrotic grey-lethal (*gl*) locus on mouse Chr 10, which we have previously mapped between the *Fyn* gene and the *D10Mit148* microsatellite marker (Vacher and Bernard 1999). In order to identify and subsequently isolate the *gl* gene, a physical map covering this region (approximately 2 cM long) (Fig. 3) (Vacher and Bernard 1999) has been established. Microsatellite markers were used first to screen several YAC libraries from different sources to insure representation and to avoid chimeric clones. These microsatellite markers (*D10Mit109*, *193*, *184*, *108*, *215*, *55*, *148*, *38*) were reported to map genetically within the mouse *gl* locus interval (Vacher and Bernard 1999). The preliminary contig assembled with the first YAC clones was incomplete and presented four gaps. These gaps left many ambiguities concerning the order of the adopted STSs (microsatellite markers). This was primarily owing to lack of integrated information about the order of the STSs that have been mapped by different approaches. However, these gaps were bridged by isolating additional clones from the same libraries using 24 novel STSs (Table 1) that we generated from insert end sequences of YAC clones flanking each gap. For each STS marker, genuine Chr 10 origin was established on human/mouse Chr 10-specific somatic cell hybrid (Sabile et al. 1997). As a result, a complete physical map composed of 103 YAC clones arranged in a

contig was generated (Fig. 1). Among the 42 fully characterized YAC clones (Fig. 1), 18 showed at least one chimeric end (43 %), and 16 (38 %) had one or both ends containing repetitive DNA and therefore were not used further. A minimum set of 14 overlapping YACs (Fig. 1), apparently non-chimeric, spans the entire region of interest (a minimal tiling path). Thus, STS and microsatellite markers that were not previously precisely mapped have been directly positioned within the region by using the YAC clones as template for PCR. In this way, six additional microsatellite markers (*D10Mit255*, *254*, *107*, *54*, *285*, *194*) were physically mapped on the complete contig, confirming their genetic localization as previously reported (Vacher and Bernard 1999) (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/mouse/index>). This mouse physical map spans ~8.5 Mb, covers the *gl* locus interval, and is homologous to the human 6q16-q21 region.

Generation of the transcript map. This physical map set the basis for generating novel polymorphic markers, and most importantly to map ESTs and known genes and to identify novel transcripts.

Four mouse genes (*Fyn*, *Cd24a*, *Aim1* and *Blimp1*), genetically localized on the proximal region of mouse Chr 10 (Burmeister et al. 1998; Vacher and Bernard 1999), were physically localized on our contig.

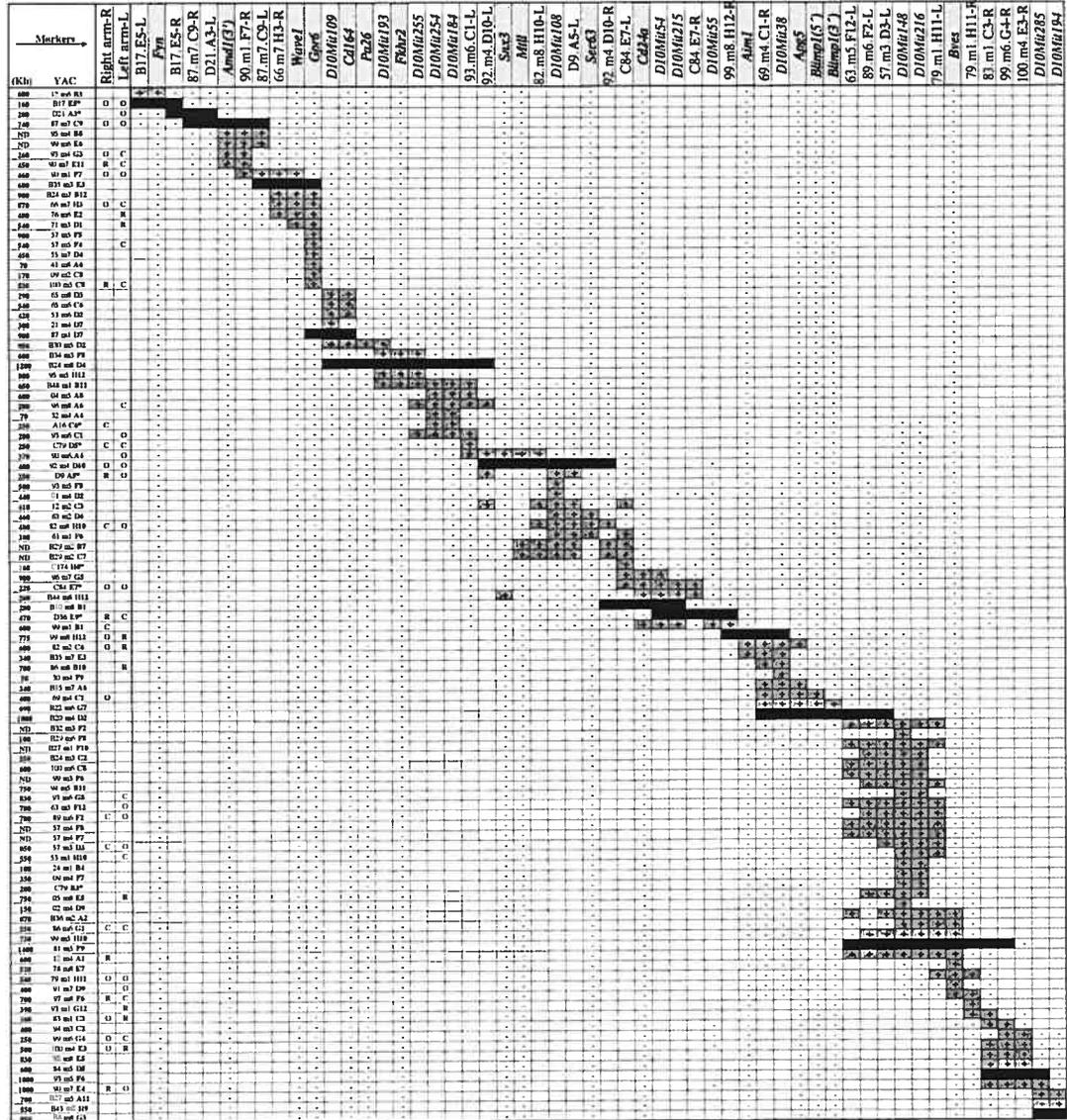


Fig. 1. Gene, EST, and STS content mapping of 103 overlapping YACs. Presence or absence of 53 PCR markers in YAC clones is indicated, respectively, as shaded boxes or (-). Open boxes indicate that PCR assays were not done. The figure also shows the YAC ends characterization: C, chimeric; R, repetitive; O, indicating that YAC terminal fragments were derived with certainty from Chr 10. 14 YACs from the minimal contig (a minimal tiling path) are indicated as black lines. Note: YAC Clones were named according to GÉNÉTHON clone addresses except those denoted with asterisks, that were named according to their original Princeton library nomenclature. Blimp1(5') was a cDNA probe marker for southern hybridization, and not a PCR marker.

Table 1. Gene, EST and STS markers developed in this study

Name	Oligonucleotide primer sequence ^a Top (Forward) Bottom (Reverse)	Product Size (bp)	T _m (°C)	MgCl ₂ final Concentration	Reference
B17 ES-L	GAATTCGGGCCATCCGAAC GGCGTCAGATCTCATTAC	322	55	1.5 mM	This work (YAC end)
<i>Fyn</i>	GGGCTGTGTGAATGTAAGG CCCAGTGTGAGAGGAGGAGTTC	220	60	1.5 mM	M27266(Gene) This work (228-447)
B17 ES-R	CTGTGGAACCTTTTTAGGGAC CTTCTTACAAGGCACAGAATAGTC	235	55	1.5 mM	This work (YAC end)
87.m7.C9-R	TCCTACCATATCAAGGCC GCTGCACTATGAGCCAGC	103	60	1.5 mM	This work (YAC end)
D21 A3-L	GAATGCATGTATGCTGCC CAGAAGAGCAGGTGGCAGAAG	233	55	1.5 mM	This work (YAC end)
<i>Amd1(3')</i>	CAATGGAATGGTGAAGTGGC ACCATCTGTGCCAATGGG	208	63	1.5 mM	AB025024 (Gene) This work (20248-20455)
90.m1.F7-R ^b (Amd1-5')	GGCTACATAGTTCAAGTCCITG TCAATGAAGCAATTTGCCTAC	147	60	1.5 mM	This work (YAC end)
87.m7.C9-L	ATGACTGGTAAATGCAGAGGC TGGCATAAAGGCTGTGATAAGGAC	196	60	1.5 mM	This work (YAC end)
66.m7.H3-R	TATTCACAAATGTGCAACGG ATATCATCACACCAAGTCCCAC	65	60	1.5 mM	This work (YAC end)
<i>Wave1</i> ^d	GAGTGGCTGAGGATGAGC CCTCTCCTCACTCTGGTCAG	~ 1300 ^c	60	1.5 mM	A1154223 (EST) This work (250-425)
<i>Gpr6</i> ^d	TGTACGTGGCATCTGCC GCTGGATCTCTGGTTCG	280	60	1.5 mM	U18549 (Human cDNA) This work (1442-1723)
<i>Cd164</i>	AGTGCTGCTGTGTAGGCAG GTGATGGCCCTCAATCTGC	158	60	1.5 mM	NM_016898 (Gene) This work (930-1087)
<i>Pa26</i> ^d	TCTGAGGCCATTACCCGG AGCAGGCAGTGAGATCCAC	198	60	1.5 mM	AA272776 (EST) This work (263-460)
<i>Fkhr2</i>	AGCGGGCGAAGATGGCAGAG ACCGATCACCATGGCCGAGC	251	60	1.5 mM	AF114259 (Gene) This work (315-565)
93.m6.C1-L	GTTGTGTAGATGTG GAATCTCATCCATCC	75	55	2 mM	This work (YAC end)
92.m4.D10-L	GCCTAGCTCTAAGACTCATACC GACATGTCTTAGCCTCTTAAGC	160	60	1.5 mM	This work (YAC end)
<i>Sax3</i>	TTAATGATTTCATCCGACCAA TGGAGCGAGGGAGTTTCAC	167	60	1.5 mM	AF062482 (Gene) This work (596-762)
<i>Mdl</i>	TTCGGGAAACTCTGTTGC TTGACCTGCATGATAGTGTCC	205	60	1.5 mM	S77482 (Gene) This work (1743-1947)
82.m8.H10-L	GACTCTAATCTAATA TTCCACTTCACTGTAG	91	55	3 mM	This work (YAC end)
D9 A5-L	TGTGCTAAGCATGTTGATGC TTCACAGGTGCACTCATG	258	55	1.5 mM	This work (YAC end)
<i>Sec63</i> ^d	CGCACCACCCATACCTG CGAGTGAGTGGACTACAGCG	198	60	1.5 mM	A1649014 (EST) This work (43-239)
92.m4.D10-R	CAGCACTCCGAGGTTCTC ATGACTGCAAAACCAAGTGC	121	60	1.5 mM	This work (YAC end)
C84.E7-L	CCACAGAAATGCAAGTTGG GAGGTCCACAGTATAAGAGG	260	60	1.5 mM	This work (YAC end)
<i>Cd21a</i> <i>D10Mit107</i>	CCACAATCTTGGCCACAC TGAGATTTGATTCTGGAAAGA	102	55	1.5 mM	X72910 (Gene) (Wenger et al. 1993)
C84.E7-R	CTAGAATCTGCTCATCC TAGTGTCTGTCCAAATG	263	55	1.5 mM	This work (YAC end)
99.m8.H12-R	GGCTGCTACCATGACCAGC CTTCTCCGTGATTGGATTCTTC	214	60	1.5 mM	This work (YAC end)
<i>Aim1</i>	GAGTTCAGTGCCTGTCCGC ATCATCAGCACCAACATCTTCC	575 ^c	60	1.5 mM	AA145430 (EST) This work (360-527)
69.m4.C1-R	TTCCATGAGTTCTCTGTGC CTGCACATTTCTCTTCC	79	63	1.5 mM	This work (YAC end)
<i>App5</i> ^d	TCTCACTGTTCAATCAAAAGTTAC CTTAGGCAGGAGAATCGAAAC	211	60	1.5 mM	BF318676 (EST) This work (49-259)
<i>Blimp1(3')</i>	CGTGTGGTACGACCTTGC ATCCAGTCTCTGCCAGTCC	156	60	1.5 mM	U08185 (Gene) This work (265-420)
63.m5.F12-L	GAGAAGTTCGGCATGGTCTAC GCTATTCAAGCTATGCACTAG	130	60	1.5 mM	This work (YAC end)
89.m6.F2-L	TTGCTCAGCCTTACTCTCC GAGTGGAAACATTTCCGGCG	393	60	1.5 mM	This work (YAC end)
57.m3.D3-L	GCTTCTTGAGATCAGGCC ATGCGTCCATACGTGGAG	173	60	1.5 mM	This work (YAC end)
79.m1.H11-L ^b (EST_C87926)	TCCAGGAGAGGAAGAAGAC ATACAGCCAAGCAAACACG	189	60	1.5 mM	This work (YAC end)
<i>Bves</i>	TGTCCTGTGAGCCAGCTCC GTCAGCCTCGATTTCAACTTAC	227	60	1.5 mM	AF124510 (Gene) This work (1209-1435)
79.m1.H11-R	CACTAGACCAGACTAGCCTCAAC GTACACGTA AAAATGGTTAGGATG	97	60	1.5 mM	This work (YAC end)
83.m1.C3-R	CAGTGGAGTGTTTACAAGCATTG CGATACCTAGATGCAGCGATAC	109	60	1.5 mM	This work (YAC end)
99.m6.G4-R	AATTCATTGCAAGAGTGCC GCAAGAGGCAACTTCCAGC	111	60	1.5 mM	This work (YAC end)
100.m4.E3-R	GAATGGTGTATCTTTGTATGAGC GATCCATTTCACTGTGACTATAGC	154	56	1.5 mM	This work (YAC end)

^aPrimer sequences are given in the 5' to 3' orientation.^bGenes or ESTs identified by sequence homology to YAC ends.^cAmplification product size was larger than expected (See text for details).^dGene marker names were given based on human homologs as no such genes were previously identified in mouse. STSs are identified by the YAC name and L or R, indicating the left or right YAC arm, respectively.

A specific PCR assay derived from the proto-oncogene *Fyn* cDNA sequence (Cooke and Perlmutter 1989) (Table 1) allowed us to map the gene on YACs B17.E5 and 12.m6.B3 (Fig. 1-3). For the *Cd24a* gene, the microsatellite marker *D10Mit107*, known to localize within the gene (Wenger et al. 1993), was used to map the mouse *Cd24a* gene to our contig. A specific PCR assay for the *Aim1* gene was designed from an EST sequence (Accession No: AA145430) and resulted in a larger PCR amplification product than expected (Table 1) owing to the presence of a 407-bp intron sequence (Accession No: 7343054), yielding a 575-bp PCR product instead of the expected 168-bp product. To map the *Blimp1* gene, two markers were used; one marker consists of a human cDNA probe corresponding to the 5'-region of the gene and allowed us to localize *Blimp1* on YACs 69.m4.C1, B22.m6.G7, and B20.m4.D2. Another PCR assay, derived from the 3'-region of the mouse gene, localized the gene on YAC B22.m6.G7 (Table 1 and Fig. 1).

The mouse gene *Amd1*, with known human homology, was previously mapped to Chr 10 by FISH (Nishimura et al. 1999). BLAST searches with YAC 90.m1.F7-R end sequence against the non-redundant database revealed a significant homology with the mouse *Amd1* gene within its 5' region (Accession No: AB025024). This homology allowed us to map *Amd1* to our contig, and a PCR assay designed from the 3'-region of the gene confirmed its localization on the same YACs (Table 1 and Fig. 3),

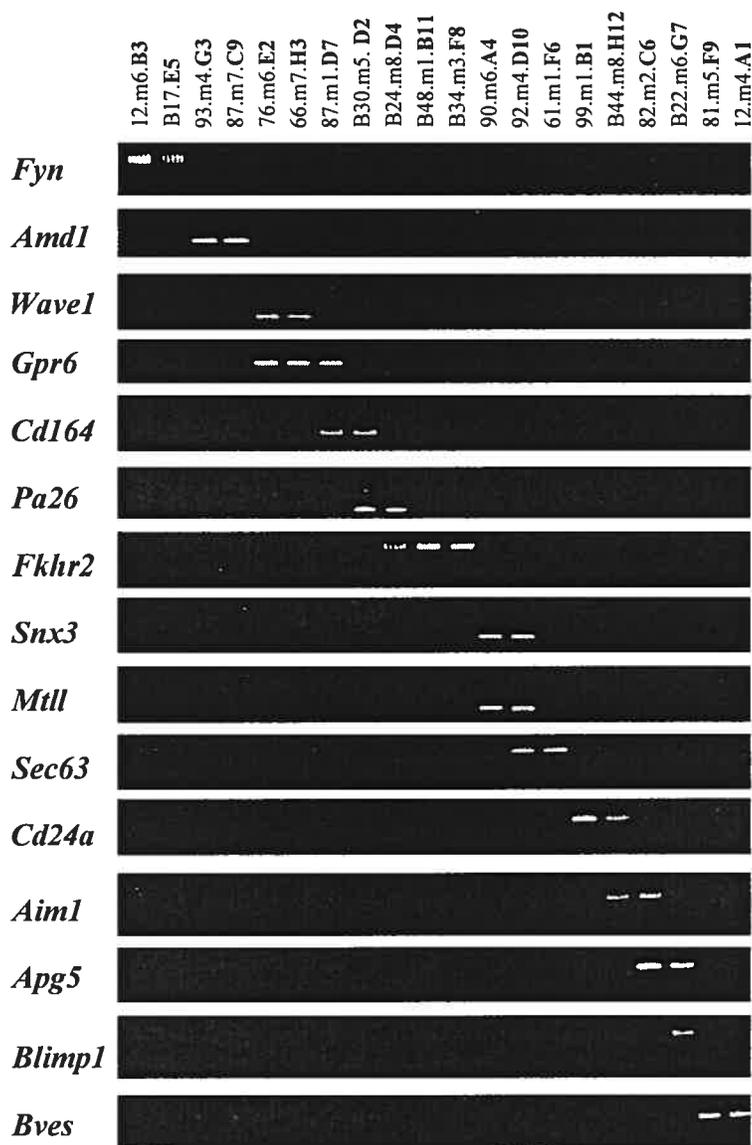


Fig. 2. Assignment and ordering of transcription units within the YACs contig interval. Genes were identified by using a combination of data from the human cytogenetic and physical maps and the mouse genetic map. Individual YAC DNA was PCR amplified by using gene-specific oligonucleotides, and the products were resolved by agarose gel electrophoresis. YACs were ordered from centromere to telomere based on STS-content mapping data. Positive PCRs were used to establish the proximal-distal order of the transcription units identified. Accordingly, their order in the contig map is specified by their appearance from top to bottom.

suggesting most likely that complete coding sequence of the gene was included in these YACs. Furthermore, as the human homologue of *Amdl1* was known to map on 6q21, this is in complete agreement with its physical localization on mouse Chr 10.

Mouse EST (C87926: Table 1) was identified by BLAST searches with YAC 79.m1.H11-L insert end against the mouse EST database. This EST did not have any overlapping ESTs and showed no human homology when aligned with the human EST database nor within the non-redundant protein database.

BLAST searches with YAC 82.m8.H10-L insert end against the non-redundant nucleotide database showed perfect alignment with a complete human sequence from 6q16-q22 region (Accession No: NT_002485). This sequence, completed by the Sanger Center, contains three known genes: TLX, SNX3 and SEC63. Mouse homologs for TLX and SNX3 (named *Mtl1* and *Snx3*) were identified through BLAST searches and mapped to our contig. For SEC63, only mouse ESTs were identified and therefore, used to map the gene to our YAC contig (Table 1 and Fig. 3).

Additional human genes mapping to the 6q16-q21 region (FKHR2, BVES, APG5, WAVE1, CD164, PA26 and GPR6) were identified through the YACs and PACs maps available at the Whitehead Institute and Sanger

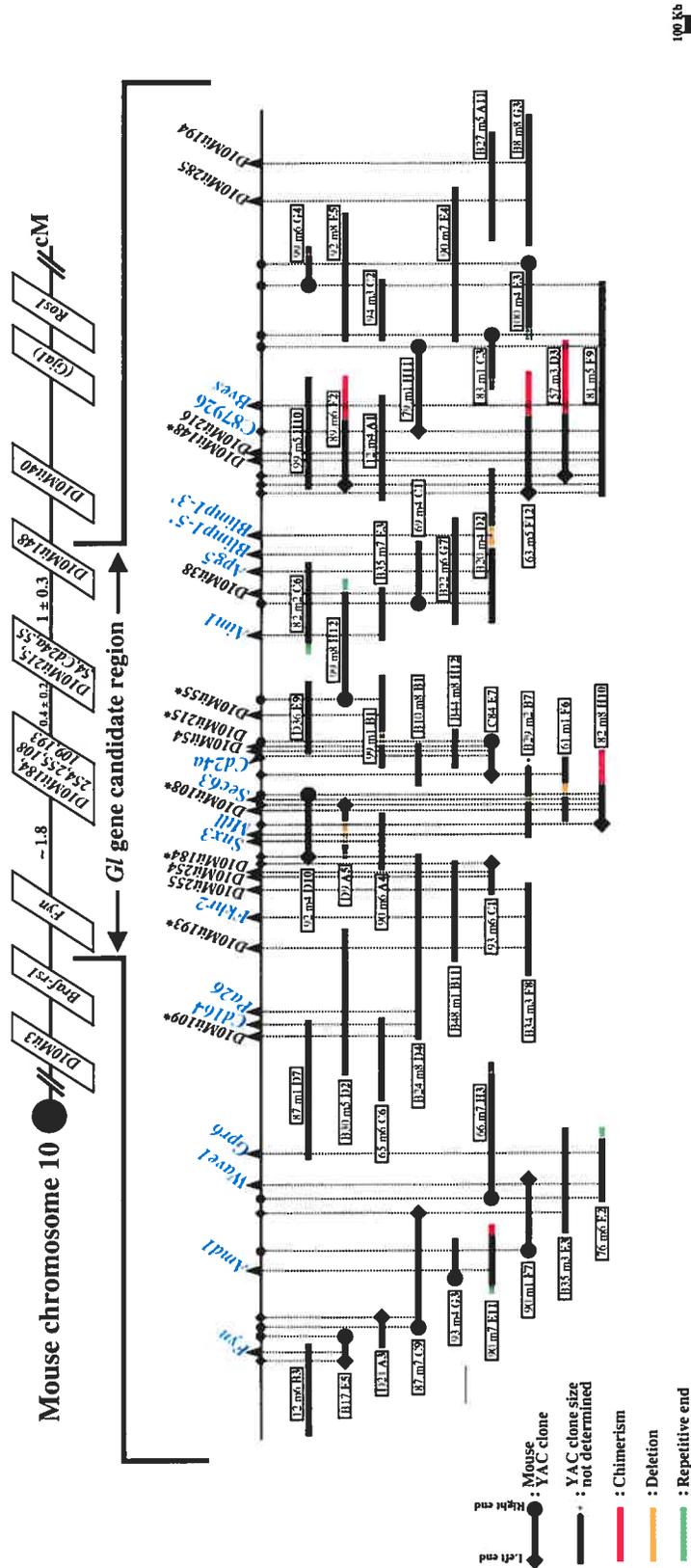


Fig. 3. Physical and transcriptional map spanning the *gl* locus. The genetic map reported previously (Vacher and Bernard 1999) for the localization of the *gl* locus is shown at the top, with the centromere indicated by a filled circle and genetic distance in cM. Genes and ESTs are highlighted in blue. The asterisks denote microsatellite markers that had been positioned within the genetic map and that were used as entry points for the construction of the contig. The physical map is drawn to a 100-kb scale and ordered based on assignment within the map, of all the YACs presented in fig. 1. Only those YACs containing more than one marker and those used to derive novel STSs are shown. The map extends from B17.E5-L (most centromeric marker) to *D10Mit194* (most telomeric marker).

Center. Among them, mouse homologs were identified for the forkhead (*Fkhr2*), *Bves*, and *Cd164* genes. *Fkhr2* was the only gene that had previously been mapped to mouse Chr 10 (Accession No: AF114259), but has never been assigned a precise physical location. Our results show that *Fkhr2* maps to the proximal region on YACs (B24.m8.D4 and B48.m1.B11) between *Fyn* and *D10Mit148* markers. mRNA sequences of mouse homologs were used to design PCR markers that allow us to map these genes to our contig (Table 1 and Fig. 3).

Finally, Mouse ESTs were identified for *Wave1*, *Pa26*, and *Apg5* homologs, with the exception of *Gpr6*, for which the rat gene coding sequence, highly conserved with the human sequence, was used to design oligonucleotides (Table 1 and Fig. 3).

In summary, the proximal mouse Chr 10 region covered by our contig shows highly conserved synteny with the human 6q16-q21 region. Order and approximate physical distance have been assigned for 15 genes, including five novel genes never before identified in the mouse. All genes were mapped to at least two YAC clones (Fig. 2), confirming the precise location and order, and excluding possible chimerism between two different regions of mouse Chr 10. Interestingly, the human 6q16-q21 region is known to be subject to major genomic rearrangements in several tumor types (Jackson et al. 2000; Guan et al. 1998; Hatta et al. 1999; Takeuchi et

al. 1998; Merup et al. 1998; Gerard et al. 1997; Sherratt et al. 1997), and genes localized in this area, such as PA26, may be related to tumor progression. Our mouse Chr 10 mapping data presented here, documenting marker content and order, will be very useful to ongoing mapping efforts of the homologous human region.

The fine-resolution physical and transcriptional map presented herein covers ~8.5 Mb of genomic DNA and provides higher resolution of the gene order and content that appear to be maintained between these two mouse and human genomic regions.

ACNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Dr. Shirley Tilghman and Georgia Guan for their continuous support for YAC libraries maintenance and providing us with individual YAC clones, and to Dr. Philip Avner for somatic cell hybrid DNA. We thank Hugues Bernard for valuable technical assistance. This work was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada and by Hoechst Marion Roussel (R97047) to J. Vacher.

REFERENCES

Burke DT, Rossi JM, Leung J, Koos DS, Tilghman SM (1991) A mouse genomic library of yeast artificial chromosome clones. *Mamm Genome* 1, 65

Burmeister M, Bryda EC, Bureau JF, Noben-Trauth K (1998) Encyclopedia of the mouse genome VII. Mouse chromosome 10. *Mamm Genome*, S200-S214

Chartier FL, Keer JT, Sutcliffe MJ, Henriques DA, Mileham P et al. (1992) Construction of a mouse yeast artificial chromosome library in a recombination-deficient strain of yeast. *Nature Genet* 1, 132-136

Cooke MP, Perlmutter RM (1989) Expression of a novel form of the *fyn* proto-oncogene in hematopoietic cells. *New Biol* 1, 66-74

Dell KM, Li YX, Peng M, Neilson EG, Gasser DL (2000) Localization of the mouse kidney disease (*kd*) gene to a YAC/BAC contig on Chromosome 10. *Mamm Genome* 11, 967-971

Frattini A, Orchard PJ, Sobacchi C, Giliani S, Abinun M et al. (2000) Defects in *TCIRG1* subunit of the vacuolar proton pump are responsible for a subset of human autosomal recessive osteopetrosis. *Nature Genet* 25, 343-346

Gerard B, Cave H, Guidal C, Dastugue N, Vilmer E et al. (1997) Delineation of a 6 cM commonly deleted region in childhood acute lymphoblastic leukemia on the 6q chromosomal arm. *Leukemia* 11, 228-232

Gerring SL, Connelly C, Hieter P (1991) Positional mapping of genes by chromosome blotting and chromosome fragmentation. *Methods Enzymol* 194, 57-77

Guan XY, Zhang H, Yang JM, Wang J, Taetle R et al. (1998) Detection of chromosome 6 abnormalities in melanoma cell lines by chromosome arm painting probes. *Cancer Genet Cytogenet* 107, 89-92

Haldi ML, Strickland C, Lim P, VanBerkel V, Chen X et al. (1996) A

comprehensive large-insert yeast artificial chromosome library for physical mapping of the mouse genome. *Mamm Genome* 7, 767-769

Hatta Y, Yamada Y, Tomonaga M, Miyoshi I, Said JW et al. (1999) Detailed deletion mapping of the long arm of chromosome 6 in adult T-cell leukemia. *Blood* 93, 613-616

Jackson A, Carrara P, Duke V, Sinclair P, Papaioannou M et al. (2000) Deletion of 6q16-q21 in human lymphoid malignancies: a mapping and deletion analysis. *Cancer Res* 60, 2775-2779

Kornak U, Schulz A, Friedrich W, Uhlhaas S, Kremens B et al. (2000) Mutations in the $\alpha 3$ subunit of the vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase cause infantile malignant osteopetrosis. *Hum Mol Genet* 9, 2059-2063

Kusumi K, Smith JS, Segre JA, Koos DS, Lander ES (1993) Construction of a large-insert yeast artificial chromosome library of the mouse genome. *Mamm Genome* 4, 391-392

Larin Z, Monaco AP, Lehrach H (1991) Yeast artificial chromosome libraries containing large inserts from mouse and human DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 4123-4127

Larin Z, Monaco AP, Meier-Ewert S, Lehrach H (1993) Construction and characterization of yeast artificial chromosome libraries from the mouse genome. *Methods Enzymol* 225, 623-637

Menasce LP, Orphanos V, Santibanez-Koref M, Boyle JM, Harrison CJ (1994) Deletion of a common region on the long arm of chromosome 6 in acute lymphoblastic leukaemia. *Genes Chromosomes Cancer* 10, 26-29

Merup M, Moreno TC, Heyman M, Ronnberg K, Grander D et al. (1998) 6q deletions in acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 91, 3397-3400

Nishimura K, Kashiwagi K, Matsuda Y, Janne OA, Igarashi K (1999) Gene structure and chromosomal localization of mouse S-adenosylmethionine decarboxylase. *Gene* 238, 343-350

Ragoussis J (1996) Restriction analysis of YACs. *Methods Mol Biol* 54, 69-74

Riley J, Butler R, Ogilvie D, Finniear R, Jenner D et al. (1990) A novel, rapid method for the isolation of terminal sequences from yeast artificial chromosome (YAC) clones. *Nucleic Acids Res* 18, 2887-2890

Rossi JM, Burke DT, Leung JC, Koos DS, Chen H et al. (1992) Genomic analysis using a yeast artificial chromosome library with mouse DNA inserts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2456-2460

Sabile A, Poras I, Cherif D, Goodfellow P, Avner P (1997) Isolation of monochromosomal hybrids for mouse chromosomes 3, 6, 10, 12, 14, and 18. *Mamm Genome* 8, 81-85

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis, T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press)

Scimeca JC, Franchi A, Trojani C, Parrinello H, Grosgeorge J et al. (2000) The gene encoding the mouse homologue of the human osteoclast-specific 116-kDa V-ATPase subunit bears a deletion in osteosclerotic (oc/oc) mutants. *Bone* 26, 207-213

Sherratt T, Morelli C, Boyle JM, Harrison CJ (1997) Analysis of chromosome 6 deletions in lymphoid malignancies provides evidence for a region of minimal deletion within a 2-megabase segment of 6q21. *Chromosome Res* 5, 118-124

Takeuchi S, Koike M, Seriu T, Bartram CR, Schrappe M et al. (1998) Frequent loss of heterozygosity on the long arm of chromosome 6: identification of two distinct regions of deletion in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 58, 2618-2623

Vacher J, Bernard H (1999) Genetic localization and transmission of the mouse osteopetrotic grey-lethal mutation. *Mamm Genome* 10, 239-243

Wenger RH, Rochelle JM, Seldin MF, Kohler G, Nielsen PJ (1993) The heat stable antigen (mouse CD24) gene is differentially regulated but has a housekeeping promoter. *J Biol Chem* 268, 23345-23352

CHAPITRE III

ARTICLE 2

SOMMAIRE

Dans le but d'identifier le gène *gl*, un nouveau recombinant de souris fut obtenu dans le laboratoire suite à la génération d'un nouveau croisement entre souris hétérozygotes *gl/+* (intercross). Les résultats combinés de la carte génétique incluant le nouveau recombinant et de la carte physique ont permis de définir une région candidate d'environ 1000 kb pour la localisation du locus *gl*.

Cet article reporte l'identification du gène *gl* murin et de son homologue humain *GL*, ainsi que la caractérisation du gène *gl* et de la protéine *Gl* correspondante.

Pour ce faire, l'établissement d'un contig de BACs couvrant l'intervalle physique de 1000 kb fut entrepris et de nouveaux marqueurs polymorphiques dérivés des extrémités de ces clones ont permis de réduire à ~ 500 kb l'intervalle physique pour la localisation du gène *gl*. Ce nouvel intervalle non-recombinant a été couvert en totalité par un contig de BACs. La région synténique humaine correspondant à cet intervalle étant complètement séquencée et ordonnée, ceci a permis de confirmer la localisation et l'ordre des gènes et ESTs dans cet intervalle. Certains de ces gènes et transcrits représentaient des candidats potentiels pour le gène *gl*.

Pour définir le meilleur candidat pour le gène *gl*, nous avons opté pour la

génération de souris transgéniques dans le but d'obtenir une complémentation fonctionnelle *in vivo*. Trois BACs ont été injectés et la complémentation fonctionnelle du phénotype ostéopérotique et de la couleur du poil a été démontrée avec le clone N3 (180 kb), suite à des analyses phénotypiques et histologiques. Une librairie génomique (shot-gun) correspondant à ce clone a été générée dans le phage M13, et la séquence de ce BAC a révélé la présence d'au moins deux gènes. Des essais spécifiques (RT-PCR, Northern) ont démontré que l'expression de l'un de ces gènes était complètement abolie chez les souris homozygotes *gl/gl*, et par conséquent ce gène fut considéré comme le meilleur candidat pour le locus *gl*. L'ADNc pleine longueur a été isolé et correspond à un ARN messager unique de ~3 kb exprimé dans le cerveau, le rein, la rate et dans les ostéoclastes obtenus en culture (OCLs) et les mélanocytes. De plus, des analyses complémentaires par hybridation *in situ* ont confirmé l'expression du gène *gl in vivo* dans le système hématopoïétique, squelettique et dans la peau, plus particulièrement dans les ostéoclastes et les mélanocytes natifs. Nous avons aussi confirmé qu'aucune expression n'était détectée chez les souris homozygotes *gl/gl*. La structure génomique du locus révèle la présence de six exons et cinq introns, couvrant environ 23 kb. Des analyses Southern ont permis de mettre en évidence un réarrangement génomique majeur au niveau du locus *gl*. L'allèle *gl* est caractérisé par une délétion d'environ 7.5 kb qui élimine la région promotrice, l'exon I et une grande partie de l'intron 1, résultant en une absence totale du messager. De plus, la

caractérisation de l'allèle *gl* a mis en évidence la présence d'un fragment de 460 pb correspondant à une portion 3'-UTR d'un élément répétitif LINE-1, marquant les limites de la délétion. La protéine GI est composée de 338 acides aminés, comprend un domaine transmembranaire potentiel, et est localisée dans le cytoplasme. L'identification du gène *gl* chez la souris a permis d'isoler son homologue humain et de caractériser la première mutation du gène *GL* associée avec le développement de la forme sévère de la maladie ostéopétrotique autosomale récessive infantile humaine. Cela permettra éventuellement le dépistage génétique et le diagnostic prénatal dans les familles potentiellement à risque.

Les résultats de cet article identifient une nouvelle protéine essentielle à la fonction et la maturation des ostéoclastes et des mélanocytes. De plus, ces résultats identifient un nouveau locus humain en 6q21 associé à l'ostéopétrose autosomale récessive maligne.

Contribution à l'article

Figures 1, 2, 3, 5 et 6: préparation et résultats

**GREY-LETHAL MUTATION INDUCES SEVERE MALIGNANT
AUTOSOMAL RECESSIVE OSTEOPETROSIS IN MOUSE AND
HUMAN**

**NADER CHALHOUB¹, NADIA BENACHENHOU¹, VENKATESH
RAJAPUROHITAM¹, MONICA PATA¹, MATHIEU FERRON¹,
ANNALISA FRATTINI², ANNA VILLA² & JEAN VACHER¹**

*¹Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Faculté de Médecine de
l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada. ²Istituto di Tecnologia
Biomediche Avanzate, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Segrate, Italy.*

Correspondence should be addressed to J.V.

e-mail: vacherj@ircm.qc.ca

Published online: 10 March 2003, doi:10.1038/nm842

Received 31 January; Accepted 14 February 2003

Nature Medicine, April 2003, volume 9, number 4, pp 399 - 406

ABSTRACT

The spontaneous mouse grey-lethal (*gl*) mutation is responsible for a coat color defect and for the development of the most severe autosomal recessive form of osteopetrosis. Using a positional cloning approach, we have mapped and isolated the *gl* locus from a ~1.5 cM genetic interval. The *gl* locus was identified in a bacterial artificial chromosome (BAC) contig by functional genetic complementation in transgenic mice. Genomic sequence analysis revealed that the *gl* mutation is a deletion resulting in complete loss of function. The unique ~3 kb wild-type transcript is expressed primarily in osteoclasts and melanocytes as well as in brain, kidney, thymus and spleen. The *gl* gene is predicted to encode a 338-amino acid type I transmembrane protein that localizes to the intracellular compartment. Mutation in the human *GL* gene leads to severe recessive osteopetrosis. Our studies show that mouse Gl protein function is absolutely required for osteoclast and melanocyte maturation and function.

INTRODUCTION

Bone development and maintenance are based on a strict balance between two opposite cellular activities. Bone formation is controlled by osteoblasts, which are of mesenchymal origin, whereas bone resorption is regulated by osteoclasts, which arise from the granulocyte-macrophage lineage^{1,2}. Perturbation of this balance can lead to a reduction of bone mass, as seen in osteoporosis, or to an abnormal accumulation of bone, as in osteopetrosis.

In humans, osteopetrosis is classified on the basis of severity and age of onset³. The autosomal recessive, infantile malignant form is the most severe. This disorder can result from two different cellular anomalies: a defect in differentiation of osteoclast progenitors, precluding the formation of osteoclasts, or a failure to activate differentiated mature osteoclasts. Both cases result in the absence of proper bone resorption and an increase in bone mass. Bones become more fragile and susceptible to fracture. In addition, patients show bone marrow underdevelopment and are frequently subject to fatal infections⁴. Other common clinical features associated with osteopetrosis are visual impairment and hearing loss⁵.

The only cure for osteopetrotic patients has been bone marrow transplantation, but this treatment relies *a priori* on appropriate immunological matching, is suitable for only a restricted number of

patients, and has had limited success^{6,7}. These limitations indicate that human malignant autosomal recessive osteopetrosis is a cell-autonomous defect. In agreement with this, a subset of this human genetic disorder has been linked to mutations in two genes involved in ion transport, *TCIRG1* and *CICN7*, which is compatible with a defect in intrinsic cellular function⁸⁻¹⁰.

Because osteopetrosis is relatively rare in humans, our understanding of osteopetrosis and osteoclast defects is based mainly on animal models, particularly the mouse. Several spontaneous, induced or targeted mouse mutants have provided most of our present knowledge of the differentiation and maturation of osteoclasts. As the osteoclast is of hematopoietic origin, genes implicated early in multiple lineage commitment, such as *Sfpil* and *Nfkb*, have an indirect but major role in osteoclastogenesis^{11,12}. In the granulocyte-macrophage lineage, the absence of colony-stimulating factor-1 (resulting from the *op* mutation), its receptor c-fms, c-fos or RANK (receptor-activator of NF-κB) affects differentiation, proliferation and survival of osteoclast progenitors¹³⁻¹⁷. Sporadic amelioration of osteopetrosis with age has been observed for the mouse *op* mutant¹⁸.

In the late osteoclast differentiation pathway, the transcription factor of the basic helix-loop-helix leucine zipper family *Mitf*, and its putative targets have been implicated in the fusion of osteoclast precursors, an essential

prerequisite for osteoclast maturation^{19,20}. After this fusion, signaling involving c-src and TRAF6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor-6) has a crucial role in subsequent maturation, as loss of function of these two proteins inhibits resorption despite normal osteoclast population levels^{21,22}. Loss of the genes encoding the 116 KD subunit of the vacuolar (V)-ATPase^{23,24} and the ClC-7 chloride channel¹⁰ is responsible for a defect in osteoclast polarization and ruffled border formation.

The spontaneous mouse model that most closely resembles the severe human malignant autosomal recessive form of osteopetrosis is the *gl* mutant²⁵. Osteopetrosis in homozygous *gl/gl* mice is fully penetrant, and death ensues consistently at 3-4 weeks of age. As for humans, functional rescue of the *gl/gl* phenotype can be obtained by bone marrow transplantation²⁶. We have shown that *gl* gene activity is critical for osteoclast maturation and function²⁷. In addition to the osteopetrotic phenotype, *gl/gl* mice display a grey coat color, instead of agouti, as a consequence of pheomelanin granules clumping in melanocytes²⁵. Thus, *gl* function seems essential and pleiotropic for normal development of two distinct cellular lineages.

We previously used positional cloning to isolate the *gl* gene. We first defined nine co-segregating polymorphic microsatellite markers that were associated with transmission of the *gl* mutation and established the genetic

interval for the *gl* locus as ~ 1.5 cM²⁸. Subsequently, we generated a yeast artificial chromosome (YAC) map that covered our candidate region²⁹. In this study, we used functional rescue by BAC transgenesis to identify the *gl* gene and characterize its mutation, tissue expression and cellular localization *in vivo* and *ex-vivo*. Our studies provide evidence that Gl is a cytoplasmic protein, with a putative single transmembrane domain, that has a role in osteoclast functional activity and melanocyte pheomelanin synthesis and localization. On the basis of the highly conserved homologous human *GL* gene that we isolated, we hypothesized that mutations affecting the *GL* gene may be responsible for the development of recessive osteopetrosis. Here, we characterize the first mutation in the human *GL* gene that leads to severe recessive osteopetrosis.

RESULTS

Physical map including the *gl* gene

On the basis of our previous genetic localization of the *gl* locus in a ~1.5 cM interval on mouse Chromosome 10 (ref. 28), we generated a YAC contig covering ~8.5 Mb, in which 15 mouse genes were precisely mapped²⁹. To further refine the *gl* region, we established a BAC contig using as entry points the markers *D10Mit184* and *Cd24a*, previously identified from our YAC physical map (Fig. 1a). After several rounds of chromosome walking, 18 overlapping genomic clones were assembled. New polymorphic sequence-tagged sites were characterized concomitantly, reducing our non-recombinant interval to ~500 kb. The boundaries of this interval, corresponding to the *gl* candidate region, were thus defined as the T7 end insert sequence of BAC 371K6 and *D10Mit184* (Fig. 1a).

Functional rescue in BAC transgenic mice

To identify potential candidate genes, we used an *in vivo* test of biological activity involving BAC transgenesis to functionally rescue the *gl/gl* phenotypes. We first ensured that C57BL/6J and C3H/HeJ genetic backgrounds were both appropriate to distinguish the microinjected BAC genotypically from the endogenous genomic region, using internal polymorphic markers. Three overlapping BACs (498E23, 373N3 and 343H5) covering ~75% of our candidate region (Fig. 1a) were injected.

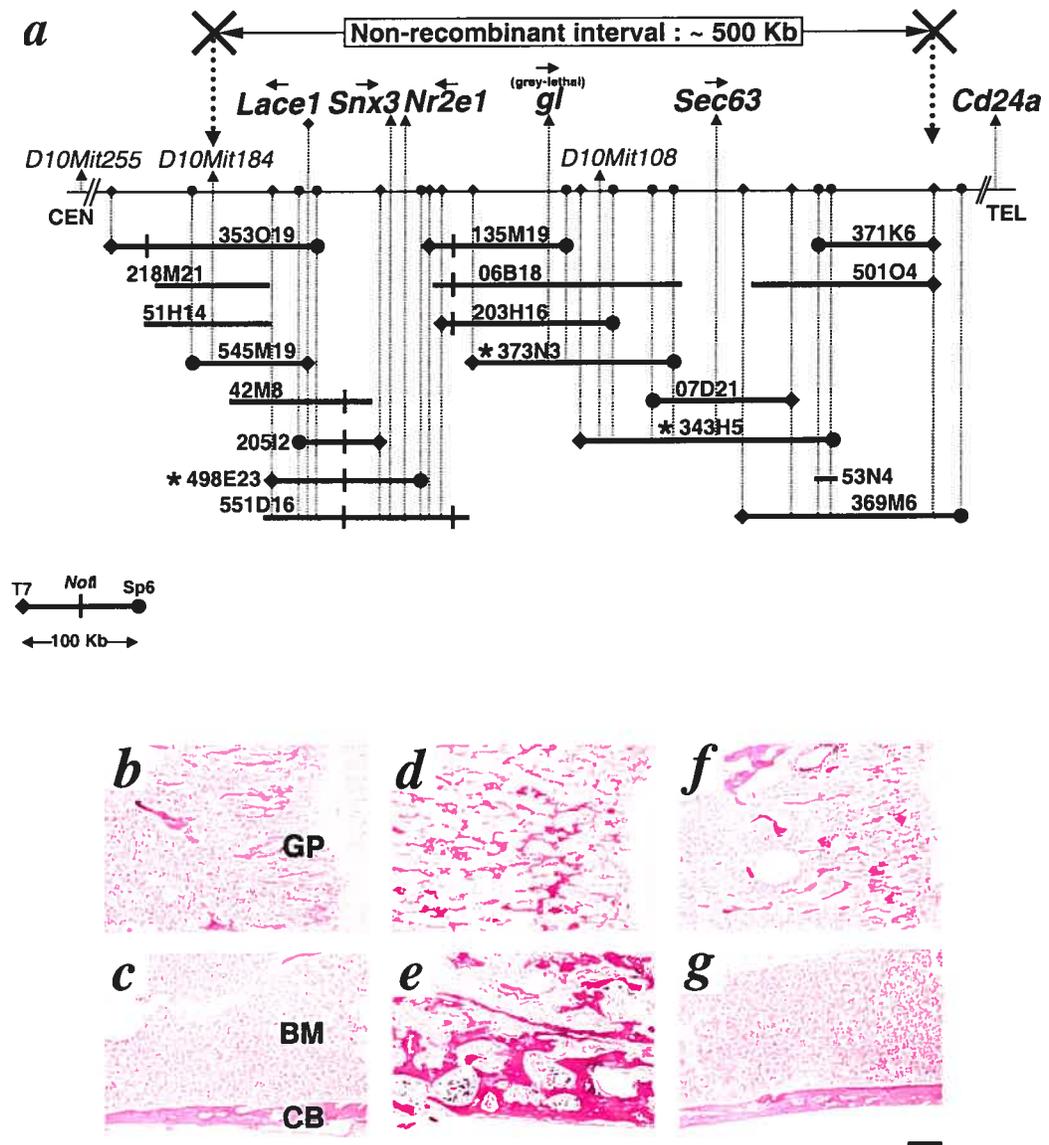


Fig. 1: Isolation of the mouse *gl* gene. **a**, Physical map of the *gl* candidate region. A ~500 kb BAC contig spanning the *gl* non-recombinant interval included 18 individual clones with the boundary markers *D10Mit184* and BAC 371K6 T7 end. Database and sequence analysis identified 4 known genes (in bold): *Lace1*, *Snx3*, *Nr2e1* and *Sec63*. Arrows indicate the transcriptional orientation of each. ◆, T7 BAC ends; ●, Sp6 BAC ends (black circles) BAC ends; |, *NotI* restriction sites; *, 3 BACs chosen for transgenesis. **b-g**, Functional rescue of osteopetrosis in BAC-transgenic *gl* mice. Bone sections from 3-week-old mice were stained with H&E. Wild-type (**b** and **c**) and *gl/gl* transgenic for BAC 373N3 (**f** and **g**) display identical histological normal phenotypes. Non-transgenic *gl/gl* mice are characterized by osteopetrosis (**d** and **e**). BM, Bone marrow; CB, cortical bone; GP, growth plate. Scale bar, 250 μ m. Magnification $\times 5$.

Founder animals were obtained with BAC clones 373N3 and 343H5. Molecular analysis of the transgenic mice showed the expected vector-insert junction, the internal polymorphic marker and normal hybridization pattern with an internal probe, indicating integrity of the transgene. The transgenic founders did not develop any obvious abnormal phenotype and transgene transmission followed mendelian distribution. The transgenic BAC mice were then successively mated to heterozygous *gl/+* mice to verify rescue of the *gl/gl* phenotypes. Offspring from these matings were analyzed using polymorphic markers not included in the injected BAC to determine the *gl* genotype and to test the BAC vector-insert junction for the presence of the transgene. Whereas non-transgenic homozygous *gl/gl* littermates exhibited the *gl/gl* phenotypes, all 17 transgenic *gl/gl* animals carrying the BAC 373N3 transgene (~6 copies) displayed normal growth, an agouti coat color, tooth eruption and appropriate bone marrow development (Fig. 1b-g). In addition, these transgenic *gl/gl* mice had a lifespan greater than two years and had no apparent age-related abnormalities. In contrast, no functional rescue was obtained with the three 343H5 BAC transgenic lines. Together, these results indicate that the *gl* mutation is linked to a gene contained in the BAC 373N3.

Identification of the *gl* gene and mutation

To define the transcription units and genes present on the BAC 373N3, a shotgun M13 phage library was generated for sequencing and the sequence

was searched using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). This 180 kb BAC clone contained one potential gene, as well as the 5' region and first exon of the *Sec63* gene. RT-PCR expression analysis showed loss of expression of one of these transcripts in *gl/gl* animals compared to wild-type littermates. This *gl* candidate was homologous to human sequences expressed in CD34⁺ hematopoietic stem/progenitor cells³⁰. Subsequently, a mouse library was screened and full-length cDNA was isolated and sequenced. Genomic and structural characterization of this mouse *gl* candidate gene indicated that the wild-type locus contains six exons and five introns, spanning approximately 23 kb (Fig. 2a).

To verify that the candidate gene did, in fact, correspond to the *gl* mutation, we characterized the genomic structure of the locus in homozygous *gl/gl* mice. In contrast to its wild-type counterpart, genomic DNA from *gl/gl* mice had a ~7.5 kb deletion as assessed by PCR and Southern analysis (Fig. 2a and b). This deletion included the promoter, extending ~4.5 kb upstream from the initiation codon, the entire first exon and a large portion (~3 kb) of the first intron (Fig. 2a and b). Detailed characterization of the deletion breakpoints showed that in the *gl* mice only, the gene had a 460 bp insertion. This short sequence was homologous to the 3' untranslated region (UTR) of a LINE1 (long interspersed nuclear element-1) retrotransposon (Fig. 2a). Based on this genomic structure, we designed a specific PCR assay to distinguish wild-type and *gl* allelic forms at this locus (Fig. 2c).

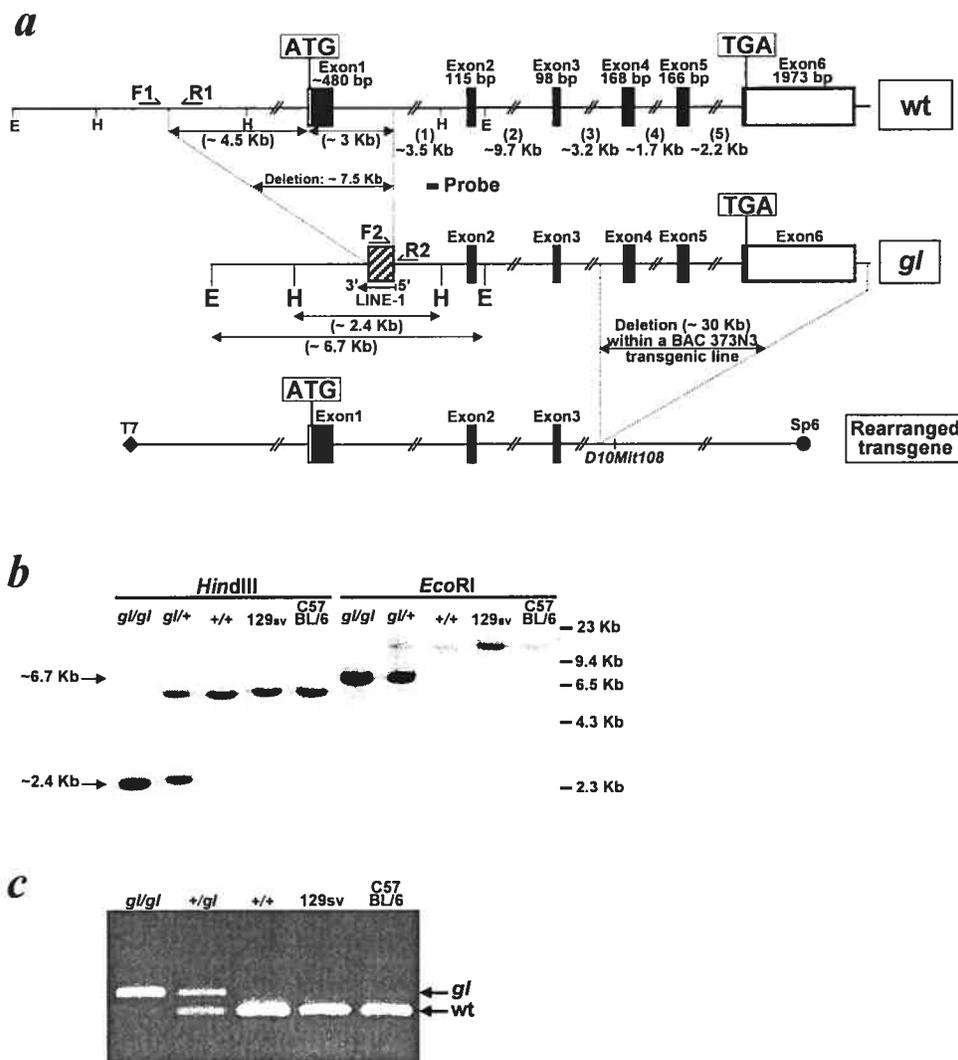


Fig. 2: Molecular characterization of the *gl* gene and mutation. **a**, Genomic structure of the wild-type (wt) mouse *gl* gene. ■, coding exons; □, non-coding sequences; ▩, 460 bp L1 sequence. The restriction sites used for Southern blot analysis are indicated as H (*Hind*III) and E (*Eco*RI). Exon and intron sizes are shown, as well as the structure of the rearranged transgene. **b**, Southern blot analysis of wild-type and *gl* genomic DNA. The fragment used as probe (thick horizontal line) is indicated in (a). The wild-type hybridization pattern consists of a ~5.9 kb *Hind*III and ~14 kb *Eco*RI fragment. The deleted *gl* allele shows shorter fragments of ~2.4 kb (*Hind*III) and ~6.7 kb (*Eco*RI). Because the *gl* background derives from 129Sv and C57BL/6, genomic DNA from both were used as controls. **c**, PCR assay design to distinguish mutated and wt alleles. Specific primer pairs F1/R1 and F2/R2 (indicated as half-arrows in a) were used for PCR amplification. The PCR products (wild-type, 236 bp; *gl*, 330 bp) were resolved on a 1% agarose gel and revealed by ethidium bromide staining.

Further evidence that we had cloned the *gl* locus was provided by an unexpected result with one of our transgenic lines. Analysis of the line with only one copy of the BAC 373N3 transgene did not show complementation of the *gl/gl* phenotypes. Although this seemed puzzling at first, molecular characterization of the transgene structure with specific probes and PCR assays showed that the *gl* candidate gene was deleted from the third intron to beyond the 3' end of the gene, leaving the promoter region intact (Fig. 2a). This genomic deletion is structurally almost complementary to the spontaneous *gl* mutation, and this transgene rearrangement was compatible with lack of complementation.

Expression pattern

Northern blot analysis of the expression of the *gl* candidate gene detected a single ~3 kb mRNA transcript, suggesting no alternative splicing or multiple transcripts. Expression of *gl* was most prevalent in brain, kidney, spleen and, to a lesser extent, in thymus, testis, heart, liver and primary osteoblasts (Fig. 3a). Osteoclasts and melanocytes, the two cell lineages known to be affected in the *gl* mouse mutant, were examined for *gl* expression by northern blot and RT-PCR. High expression of the *gl* gene was detected in wild-type osteoclast-like cells (OCLs) differentiated in co-culture, whereas no expression was observed in OCLs derived from *gl/gl* mice (Fig. 3a). In addition, the wild-type immortalized melanocyte (melan-a) cell line expressed *gl*, consistent with the *gl/gl* phenotype (Fig. 3a). To

confirm osteoclast *gl* expression *in vivo*, we used *in situ* hybridization to show that *gl* was expressed in wild-type resident multinucleated osteoclasts (Fig. 3b), whereas no expression was detected in any of the homozygous *gl/gl* tissues examined. Together, these expression studies in osteoclasts and melanocytes strongly support the validity of this candidate as the *gl* gene.

Complementary expression analysis by *in situ* hybridization was performed at early embryonic stages (embryonic day (E) 12.5, E15.5 and E18.5) as well as postnatally (postnatal day (P) 1, P5 and P10). Expression of *gl* was specifically detected in fetal liver, neuronal and bone tissues (E12.5 and E15.5). High expression was detected in thymus and gut at E18.5 and continued postnatally (Fig. 3c). Expression in bone (mandible and vertebrae) and brain tissues (cerebellum, hippocampus and cortex) remained high after birth. In addition, high *gl* expression was detected in kidney, spleen and skin at P5 and P10 (Fig. 3c).

Because phenotypic rescue resulted in agouti coat color and normal tooth eruption, we investigated whether molecular complementation occurred at the tissue level. Northern analysis showed that expression of the *gl* transcript was re-established in transgenic, but not in non-transgenic, homozygous *gl/gl* offspring (Fig. 3d). In these rescued transgenic *gl/gl* mice, multinucleated osteoclasts showed high *gl* expression *in vivo*, as expected with the multiple-copy transgene (Fig. 3d). In contrast, *gl/gl* mice with the

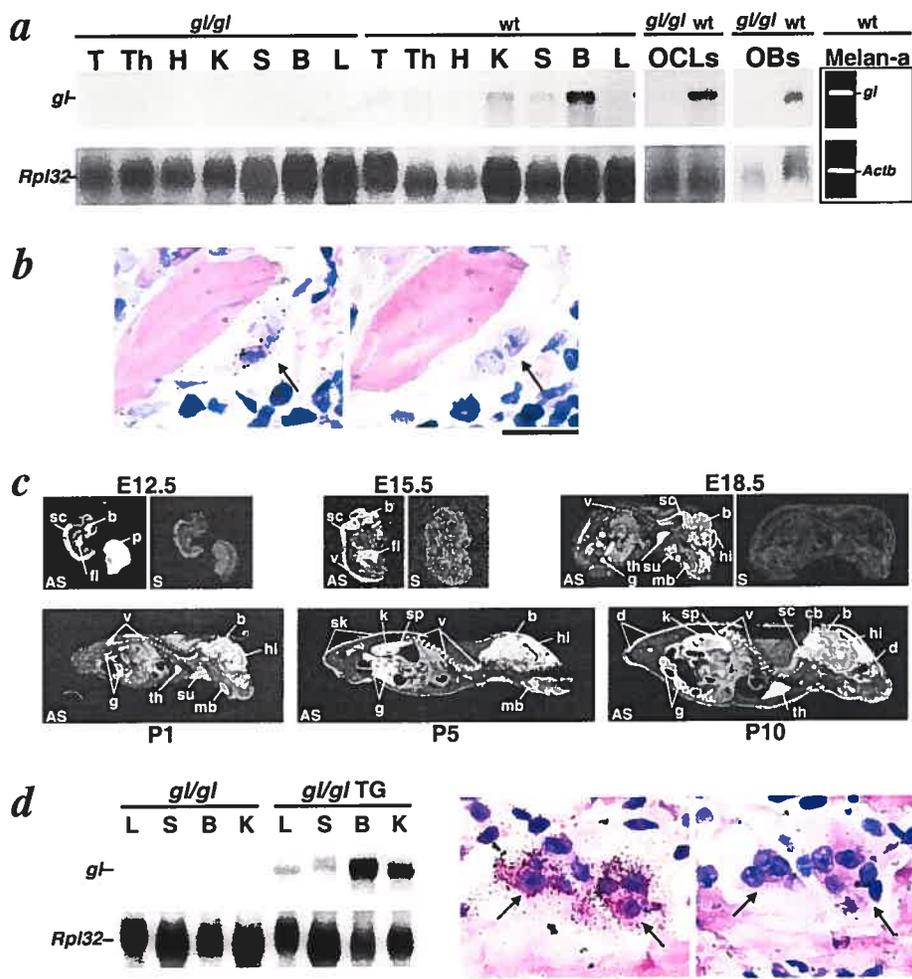


Fig. 3: *gl* expression pattern. *a*, Northern analysis of total RNA using the *gl* cDNA probe detected variable expression of a unique ~3 kb transcript in multiple mouse adult tissues. T, testis; Th, thymus; H, heart; K, kidney; S, spleen; B, brain; L, liver; Obs, primary osteoblasts. The transcript was undetectable in *gl/gl* samples. Expression of *gl* was detected by northern analysis in OCLs and primary osteoblasts and by RT-PCR in the melan-a cell line. *b*, *In situ* hybridization analysis of adult wild-type bone sections with an antisense (AS, left) probe showed *gl* expression in multinucleated osteoclasts. No signal was detected with the sense (S, right) probe. *c*, *gl* expression during development detected by *in situ* hybridization. Inverted images showing real-size sagittal sections from embryonic stage E12.5 to postnatal stage P10, after film exposure. Specific expression appears bright on a dark field. Tissues displaying high and specific expression are spinal cord (sc), fetal liver (fl), brain (b), placenta (p), vertebra (v), gut (g), thymus (th), submandibular gland (su), mandible (mb), hippocampus (hi), cerebellum (cb), kidney (k), spleen (sp), skin (sk), and dermis (d). *d*, Northern analysis detected high expression of the ~3 kb *gl* transcript in *gl/gl* BAC 373N3-transgenic mice, compared with non-transgenic homozygous *gl/gl* mice. *In situ* hybridization with an AS probe (left) detected *gl* expression in multinucleated osteoclasts from transgenic mice. No signal was detected with the S probe (right). TG, transgenic. *b* and *d*, Scale bars, 25 μ m; magnification $\times 100$.

truncated BAC transgene showed no expression of the candidate *gl* gene, as monitored by RT-PCR (data not shown). Together, the genomic localization, expression analysis and phenotypic complementation strongly suggest that we have identified the *gl* locus.

G1 protein structure and localization

The open reading frame of the *gl* gene encodes a 338-amino acid protein with an expected molecular mass of 38 kD. Searches in several protein sequence databases did not identify any significant homology between the G1 polypeptide sequence and known proteins. Hydropathy (Kyte-Doolittle; Fig. 4a) and protein topology (TmPred; data not shown) analysis suggested the presence of a potential cleavable secretory signal peptide and one putative transmembrane domain.

To study the G1 protein, we raised two specific G1-specific polyclonal antibodies (called G11 and G12) that correspond to two different epitopes on either side of the putative transmembrane domain of the G1 protein (Fig. 4a). Western blotting with G11 and G12 (data not shown) detected two specific bands in wild-type osteoclasts, corresponding to proteins of ~34 kD and ~38 kD. In contrast, no G1 protein was detected in extracts from *gl/gl* cells (Fig. 4b). As internal control, a polyclonal antibody against the 31-kD subunit of the V-ATPase proton pump³¹ was used to confirm the integrity of the extracts and the pre-immune serum for antisera specificity (data not

shown).

To determine the subcellular localization of the Gl protein, immunofluorescence analysis was carried out using native osteoclasts cultured on glass cover slips. Using the Gl1 antibody, wild-type osteoclasts were shown to display strong specific immunoreactivity in the cytoplasm (Fig. 4c-f). Specific Hoechst staining identified the multinucleated osteoclasts and showed that Gl expression was undetectable in nuclei, suggesting that Gl is most likely a cytosolic protein.

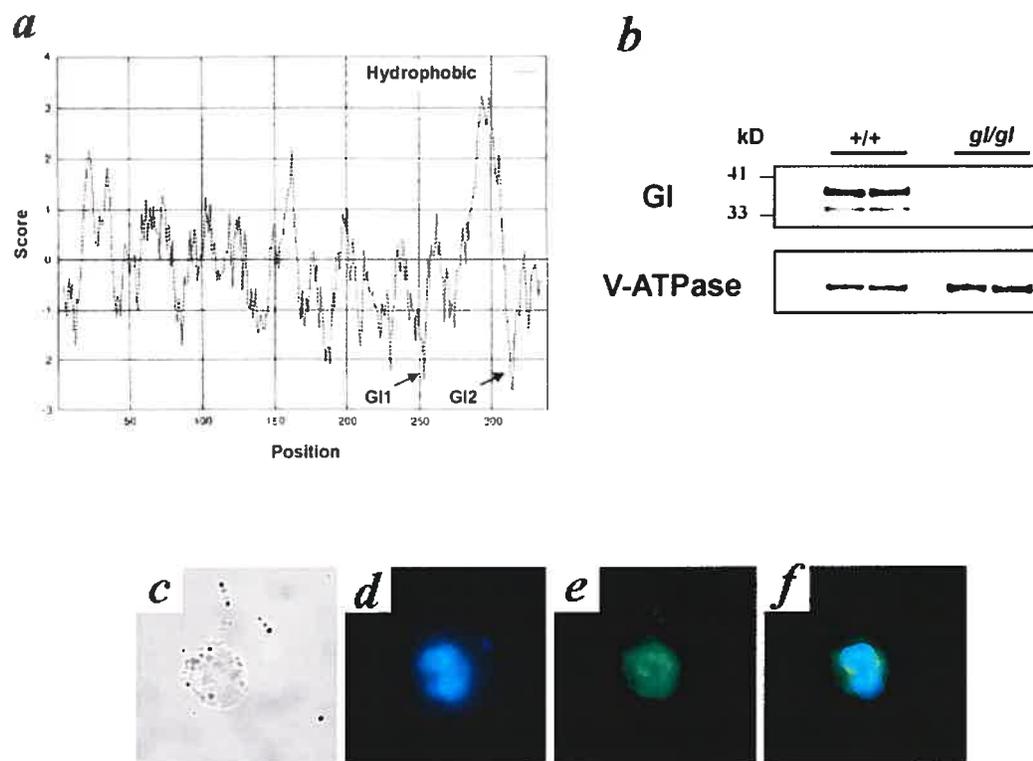


Fig. 4: Expression and immunolocalization of the G1 protein. *a*, Kyte-Doolittle hydropathy plot of G1 protein sequence. G11 and G12 denote position of the peptides used to generate polyclonal antibodies against the G1 protein. *b*, Western blot analysis using G11 antibody on OCL protein extracts from wild-type and *gl/gl* cultures. Specific ~34- and ~38-kD proteins are present in wild-type cell extracts but are undetectable in *gl/gl* cell extracts. Polyclonal antibody against the 31-kD subunit of the V-ATPase was used as a positive control. *c-f*, Osteoclasts from wild-type animals of a *gl/+* intercross were processed for immunofluorescence microscopy using G11 rabbit antibodies. *c*, overall osteoclast cell shape by phase contrast microscopy; *d*, multinucleated osteoclast nuclei with Hoechst stain; *e*, cytosolic localization of the G1 protein using G11 polyclonal antibody; *f*, merge of *d* and *e*. Approximately 10 osteoclasts were assessed, all showing identical protein sublocalization. Magnification $\times 30$.

Human homolog of the *gl* gene

Database searches with the full-length mouse G1 protein sequence identified homologs in several vertebrate species, *Drosophila melanogaster*, and *Caenorhabditis elegans*, but no obvious yeast homolog was detected, indicating that the G1 protein may be restricted to multicellular organisms. No human homologous gene was identified in public databases. Therefore, we assembled the human *GL* gene by combining information derived from our mouse gene intron and exon structure, a human PAC (P1-derived artificial chromosome) sequence and highly conserved human expressed sequence tag clone sequences.

Mouse	MARDAELARSSGWPWRWLPALLLQLLRWRCALCALPFTSSRHPGFADLLSEQQLLEVQD	60
Human	MEPGPTAAQRRCSLPPWLPLGLLWS---GLALGALPFGSSPHRVFHDLLSEQQLLEVED	57
Mouse	LTLSLLQGGGLGPLSLLPPDLPDLEPECRELLMDFANSSAELTACMVR SARPVRLCQTCY	120
Human	LSLSLLQGGGLGPLS-LPPDLPDLDPECRELLDFANSSAELTGCLVRSARPVRLCQTCY	116
Mouse	PLFQQVAIKMDNISRNIGNTSEGPRCGSLLTADRMQIVLMVSEFFNSTWQEANCANCLT	180
Human	PLFQQVVSKMDNISRAAGNTSESQSCARSLLMADRMQIVVILSEFFNTTWQEANCANCLT	176
Mouse	NNGEDLSNNTEDFLSLFNKTLACFEHNLQGHYSLLPKKNYSEVCRNCKEAYKNLSLLYS	240
Human	NNSEELSNSTVYFLNLFNHTLTCFEHNLQGNHSLLTQKNYSEVCKNCREAYKTLSSLYS	236
Mouse	QMQLNGLNKAEPETHLCIDVEDAMNITRKLWSRTFNCSVTCSDTVSVVAVSVFILFLP	300
Human	EMQKMNELENKAEPGTHLCIDVEDAMNITRKLWSRTFNCSVPCSDTVPVIAVSVFILFLP	296
Mouse	VVFYLSFLHSEQKKRKLILPKRLKSSTSFANIQENAT	338
Human	VVFYLSFLHSEQKKRKLILPKRLKSSTSFANIQENSN	334

Fig. 5: Alignment of the predicted amino acid sequences of mouse and human G1 proteins (using ClustalW). Shaded residues are conserved between the 2 proteins. Arrowhead indicates a potential cleavage site for the signal peptide. The C-terminal transmembrane domain is underlined.

The human *GL* protein consists of 334 amino acids; its sequence is 83% homologous to the mouse protein. The major difference between these two proteins is confined to a 31-amino acid stretch at the N-terminal end, predicted by Target P software to be a putative secretory signal peptide conserved in the *GI* proteins (Fig. 5).

Osteopetrotic patient with *GL* mutation

Genome sequence analysis of 19 autosomal recessive osteopetrotic patients was carried out on the entire coding exons (including flanking intronic regions), the 5' UTR and the polyadenylation site of the *GL* gene. One mutation, found in a patient of Italian origin, consisted of a G→A transition at position +5 of the donor splice site of intron V (IVS5+5 G→A; Fig. 6a). The patient was homozygous for this mutation, which correlates with the recessive nature of the disease. This mutation was not found in 100 control chromosomes that were tested using the *ApoI* (R/AATTY) restriction site generated by this mutation (wild-type allele: gTAAGTTt; mutated allele: gTAAATTt). Conversely, sequence analysis of DNA from the asymptomatic parents showed heterozygosity for this mutation (Fig. 6a).

To study the effect of the mutation on transcription of the *GL* gene, an RT-PCR assay was designed to span exon 5. RT-PCR on total RNA isolated from cultured fibroblasts that usually express *GL* did not detect the

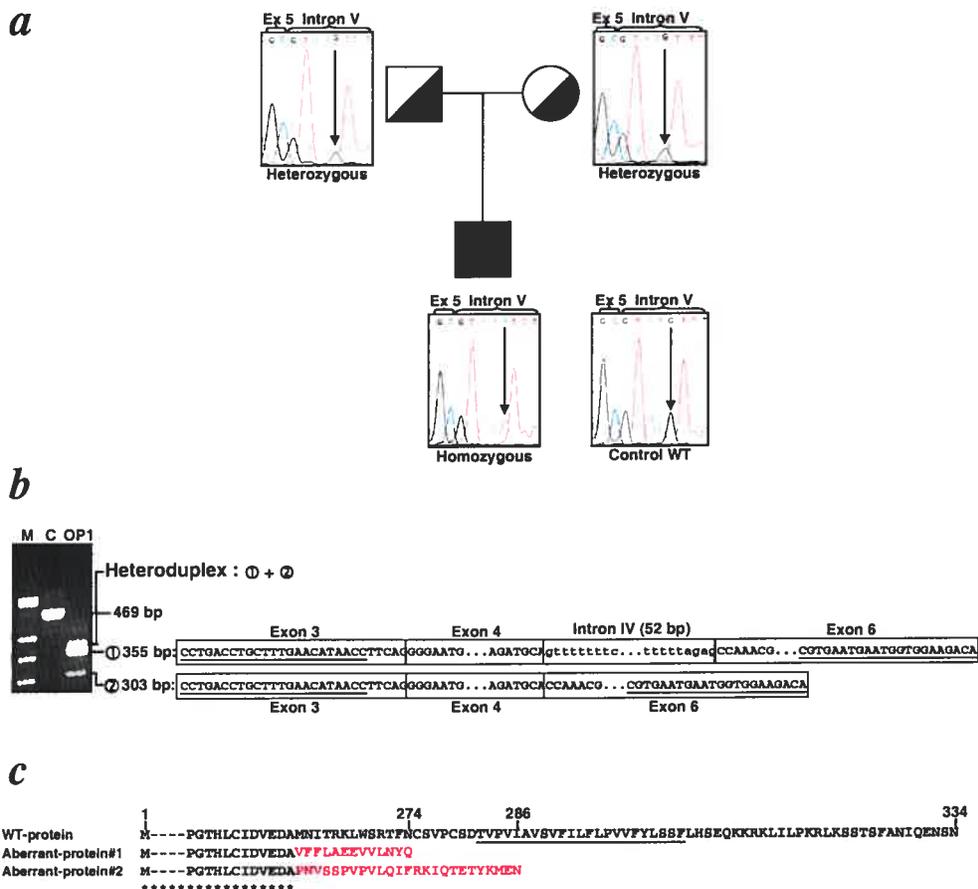


Fig. 6: DNA and RNA analysis of a patient with infantile malignant osteopetrosis. *a*, Pedigree of the affected patient harboring a mutation in the *GL* gene. Chromatograms show a homozygous G→A mutation at position +5 of the donor splice site in intron V of the *GL* gene for a patient with recessive infantile malignant osteopetrosis (■) as compared with an unrelated wild-type control (WT). The mutation co-segregates with the disease in the family, as both parents are heterozygous (◻, father; ◐, mother). *b*, RT-PCR amplification across exon 5 of the *GL* gene. Identity and sequence of PCR products are indicated. Underlined sequences correspond to the primers used in RT-PCR. M, markers (1-kb ladder); C, unrelated wild-type control; OP1, osteopetrotic patient 1. Sizes and corresponding structure of the PCR products are marked ① and ②. Boxes delineate exon junctions. Exonic sequences are in upper-case letters; intronic sequences are in lower-case letters. *c*, Alignment of the wild-type *GL* amino acid sequence with the 2 aberrant hypothetical proteins. Frameshifts and nonsense sequences with the new stop codons are shown in red. Both sequences lack the region corresponding to the putative transmembrane domain (underlined residues). *, shared amino acid residues.

expected 469-bp product in the osteopetrotic patient compared with wild-type control. In fact, three new products of smaller size were present, which may most likely correspond to aberrant splicing transcripts (Fig. 6b). Direct sequencing revealed that all three forms lacked exon 5. The sequence of the major 355-bp form indicated the presence of an additional 52-bp fragment from intron IV that resulted from use of cryptic acceptor (cag) and donor (gtatgt) splice sites (localized at -166 bp and -113 bp upstream of exon 5, respectively). The minor 303-bp form corresponds to a fusion between exon 4 and exon 6 and the skipping of exon 5. Finally, the third amplification product represented a heteroduplex between the 355-bp and 303-bp forms (Fig. 6b). Thus, the IVS5+5 G→A mutation leads to exon skipping and produces aberrant transcripts and hypothetical aberrant proteins (Fig. 6c).

DISCUSSION

Our study characterized for the first time the gene and the protein, encoded at the mouse *gl* locus, that are implicated in osteoclastogenesis and pheomelanogenesis, and showed that a mutation in the homologous human *GL* gene can underlie the development of severe autosomal recessive infantile malignant osteopetrosis. The spontaneous *gl* mutation consists of a genomic deletion encompassing the 5' region of the gene. Consequently, the *gl* transcript and protein are completely undetectable in homozygous *gl/gl* mice, correlating with the *gl* phenotypic abnormalities, whereas they are normally highly expressed in wild-type osteoclasts and melanocytes. The *gl* gene encodes a cytosolic protein that includes a putative secretory signal peptide and one potential transmembrane domain.

For our positional cloning of the *gl* locus, a BAC physical map of the *gl* candidate region was established and the *gl* genomic interval was reduced to ~500 kb. Functional identification of the *gl* gene was then undertaken by using BAC transgenesis for phenotypic rescue. Because the *gl* grey coat color is visible only on an agouti background (*Aa* or *AA*), the transgenic mice were crossed successively to heterozygous *gl/+ AA* animals to ensure phenotypic coat color scoring. All F₂ genotypically homozygous *gl/gl* transgenic animals produced from a ~180 kb BAC-transgenic line had a completely wild-type phenotype, as evidenced by agouti coat color and

normal tooth eruption, bone marrow development and life span. This transgenic approach provided a positive biological assay and reduced our candidate region to a ~180 kb physical interval.

Sequence analysis of the BAC that complemented the *gl/gl* phenotypes defined two transcription units. One of these candidate genes showed loss of expression in *gl/gl* animals, strongly suggesting that this transcript corresponds to the *gl* locus. Consistently, a spontaneous rearrangement in this candidate gene in one transgenic line led to undetectable transgene expression by RT-PCR assays and to a lack of complementation on a *gl/gl* background. This candidate *gl* gene encodes a unique transcript with homology to human expressed sequence tags from CD34⁺ hematopoietic stem/progenitor cells³⁰. Based on localization and loss of expression in mutant animals and in a rearranged transgene, we considered this transcript as the best candidate for the *gl* locus.

Additional support for the identification of the *gl* gene was obtained following genomic structural characterization of the *gl* mutation. First, comparison of the structures of the candidate locus in wild-type and *gl* mice detected a deletion for the *gl* mice. This deletion spanned ~7.5 kb, including the promoter, the first exon and a large part of the first intron. Second, the *gl* genomic sequence had an additional 460 nucleotides, identical to the 3' UTR region of a LINE1 element, at the deletion breakpoints. As a result of

this genomic structure, the wild-type and mutated alleles can be distinguished at any age and before phenotypic scoring. Most importantly, the deletion was compatible with the lack of detectable mRNA in homozygous *gl/gl* mice, strongly indicating that this deletion is the *gl* mutation. The 3' UTR of the LINE1 portion of the *gl* mutated allele is virtually identical to that of the beige allele³². This result indicates that we have identified the *gl* locus. Definite evidence that we have cloned the *gl* gene was obtained recently by coat color rescue in *gl/gl* transgenic mice specifically expressing *gl* cDNA in melanocytes (M.P. and J.V., unpublished data).

The candidate *gl* mRNA is expressed in several adult tissues, as assessed by northern blotting, RT-PCR and *in situ* hybridization. High expression was detected in osteoclasts and melanocytes, consistent with the phenotype observed in *gl/gl* animals. We also found substantial *gl* expression in brain, spleen and kidney tissues, where the protein may have a crucial function. Embryonic expression confirmed our adult tissues analysis, with an early induction of *gl* during hematopoiesis, brain development and ossification as well as at later stages in kidney, spleen and skin. These complementary results are consistent with a potential role of *gl* in these tissues, although no specific alterations have been reported in some of those tissues.

Structure analysis showed that the Gl protein contains a putative signal

peptide at the N-terminal end and one membrane-spanning domain in the C-terminal region. Western blot analysis of protein extracts from OCLs, using Gl-specific antibodies raised against distinct regions of the protein, detected two bands of ~34 kD and ~38 kD. The latter probably represents post-translational modifications of the protein; neither protein was present in *gl/gl* extracts. Cellular localization of the Gl protein seems to be cytosolic and excluded from the nucleus. This agrees with our previous results showing that the *gl/gl* phenotype in osteoclasts is associated with a defect in cytoskeletal rearrangement at the late cell maturation stage²⁷. At this stage, several ongoing processes could be altered, leading to dysfunction. Possible roles for Gl include cellular polarization, transcytosis pathways (exocytosis and endocytosis) and extracellular acidification³³⁻³⁶. Similar to the osteoclast impairment, the coat color defect associated with the *gl* mutation does not affect differentiation, but rather melanocyte maturation. In *gl* melanocytes, migration of only the yellow pigment is hindered, causing the coat to appear grey²⁵. The clumping of the pheomelanin granules may result from a defect in localization, trafficking or exocytosis. Together, the coat color and osteopetrotic defects indicate that the Gl protein has a role in intracellular protein trafficking or localization or both.

In this study, we showed for the first time that a mutation in the human *GL* gene can underlie the development of severe autosomal recessive infantile malignant osteopetrosis. Nineteen autosomal recessive osteopetrotic

patients with no mutations in the *TCIRG1* and *CICN7* genes were further analysed for the presence of mutations in the human *GL* gene. One mutation was identified that corresponds to a G→A substitution at position +5 of the donor splice site of intron V of the *GL* gene. The patient was homozygous for this mutation, whereas both asymptomatic parents were heterozygous for the same mutation, consistent with the genotype-phenotype correlation. The patient died at one month of age, indicating that loss of *GL* expression results in a severe abnormal phenotype and an early death, similar to the mouse *gl* phenotype. The severity of the osteopetrotic disease may explain why only one mutation was found among the 19 patients tested, as mutations in the *GL* gene may cause prenatal or perinatal death of affected individuals.

In summary, we used positional cloning of the *gl* gene to identify a protein essential for both osteoclast and melanocyte maturation and function. We have also discovered a human locus on 6q21 associated with recessive infantile malignant osteopetrosis. Deciphering the interactions of the *GL* protein may lead to the characterization of novel signaling pathways and provide insights into fundamental molecular and cellular processes implicated in bone resorption and melanocyte biology. In the future, the *GL* protein may serve as a target for therapeutic approaches against osteopetrosis, osteoporosis and other osteoclast defects.

METHODS

Mice

The mouse strain *GL/Le dl⁺+/+gl* was obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine) and mated to generate homozygous *gl/gl* mice. This strain has been maintained by forced heterozygous matings and is thus considered as a balanced inbred strain. Homozygous mice displayed a typical grey coat color (instead of agouti), major growth retardation and a lack of tooth eruption. At 3 weeks of age, animals produced from these matings were genotyped at the *gl* locus by using co-segregating polymorphic markers that defined a congenic region, potentially of 129Sv origin as previously described²⁸. Animal use complied with the guidelines of the Canadian Committee for Animal Protection and was approved by the local institutional animal care committee.

BAC library screening and contig establishment

The 129/Sv California Institute of Technology mouse BAC library (Research Genetics, Huntsville, Alabama) was screened by PCR using the microsatellite markers *D10Mit184* and *D10Mit108*. PCR conditions were as described²⁸. Filters were hybridized with the PCR-product probe.

Production of BAC transgenic mice

Circular BAC DNA (1 ng/ μ l) was injected into fertilized mouse oocytes isolated from F₁ (C3H \times C57BL/6) \times C57BL/6 crosses. Transgenic founders were identified by PCR using specific BAC end-junction sequences and internal polymorphic markers. Each founder was successively crossed with agouti *AA* heterozygous *gl*⁺ mice to obtain *gl*/*gl* BAC transgenic mice. The F₂ *gl*/*gl* transgenic mice were then identified by homozygosity at the polymorphic *D10Mit55* and *D10Mit255* loci²⁸. Histology was performed on bone samples as described²⁷. To characterize BAC gene content, a shotgun M13 phage library was generated and sequenced. BLAST analysis was used in parallel to define transcription units.

***gl* cDNA isolation**

To isolate the full-length *gl* cDNA, we screened a C57BL/6 mouse spleen cDNA library (Stratagene, Cedar Creek, Texas) by PCR with *gl* forward 5'-GGCGAGCTATCTGTTACAGTCC-3' and *gl* reverse 5'-TTACTGGCACAACGTGAGGTC-3' primers. PCR conditions were as described²⁸ with a 63 °C annealing temperature. The last step of screening consisted of filter hybridization using the PCR-product probe.

***gl* gene structure and mutation**

Intron-exon boundaries were characterized by aligning the mouse cDNA sequence against the BAC genomic sequence. Intron size was defined

according to the BAC sequence. The genomic structure of the *gl* locus was determined by Southern blot analysis after several restriction enzyme digests of DNA from *gl/gl*, *gl/+* and *+/+* animals²⁸ with 129/Sv and C57BL/6 DNA as controls. Probes from various regions of the *gl* cDNA were used.

To distinguish wild-type and mutated alleles of *gl*, a specific PCR screening assay was conducted with wild-type forward F1 5'-CCTCTGGAAGACTAATACTTGCTG-3' and wild-type reverse R1 5'-GCCTGGAACAGAGCAAAGC-3' primers, and *gl* forward F2 5'-GCTACATCTGGGTCCTTTCG-3' and reverse R2 5'-CGCTTGCTTTTGTCTGTTACCTTTGTGTTC-3' primers. PCR amplification conditions were 94 °C, 5 min followed by 30 cycles (94 °C, 30 s; 65 °C, 30 s; 72 °C, 30 s).

Expression analysis

Expression of the *gl* gene was analysed by northern blotting³⁷, RT-PCR and *in situ* hybridization. Total RNA was isolated from adult mouse brain, liver, spleen, kidney, heart, thymus and testis as described³⁷. Total RNA from OCLs, primary osteoblasts and melanocytes (melan-a cell line³⁸) were isolated with TRIzol (Gibco-BRL, Burlington, Ohio). RT-PCR analysis was conducted as described²⁷ with a 65 °C annealing temperature, using *gl* forward 5'-CCTGCTTTGAGCATAACCTGC-3' and reverse 5'-TTACTGGCACAACGTGAGGTC-3' primers. For *in situ*

hybridization^{39,40}, the *gl* sense and antisense riboprobes were generated by T3 and T7 polymerase transcription of the 0.5 kb 3' UTR fragment, cloned into pBluescript (Stratagene) and linearized by *KpnI* and *SpeI*, respectively.

G1-specific antibodies

Rabbit polyclonal antibodies G11 and G12 were raised against multiple-antigen peptides LNGLENKAEPETHLC-MAP and LHSEQKKRKLILPKR-MAP, respectively. OCLs were obtained by co-culturing 1-day-old FVB/NJ calvarium osteoblasts and spleen cells of +/+ or *gl/gl* mice. Lysates prepared as described²⁷.

Western blotting

Protein extracts (25 µg) were resolved on 12% SDS-PAGE gels, transferred onto nitrocellulose membranes and probed²⁷ with polyclonal G11 (1:100) or V-ATPase-specific antibody (1:500).

Immunofluorescence

Immunofluorescence was conducted on wild-type osteoclasts isolated from bone of 3-day-old pups and cultured overnight on slides²⁷. Samples were fixed in 4% paraformaldehyde and incubated for 1 h in PBS containing 0.1% BSA, 0.05% saponin and 5% normal goat serum and subsequently for 1 h with G11 primary antibody (1:50). After washing in PBS, slides were

incubated with secondary AlexaFluor 488-conjugated goat antibodies against rabbit IgG (1:100; Molecular Probes, Eugene, Oregon), for 1 h in the dark. For Hoechst staining, slides were incubated with a 1:1500 dilution of a 0.5 mg/ml Hoechst 33258 at room temperature for 10 min. Samples were mounted in FluorSave (Calbiochem, Mississauga, Ontario) and images were captured using a confocal microscope (Axiophot, Zeiss, Toronto, Ontario).

Screening for mutations in the human *GL* gene and RT-PCR on patient RNA

Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes using standard procedures and after approval of the local ethical review committee. Primers used for the amplification of all coding exons, intron-exon boundaries and 5' and 3' UTRs were deduced from the human PAC clone genomic sequence under GenBank accession no. Z98200. Direct automated sequencing was conducted on PCR products using CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing (Beckman-Coulter, Fullertown, California). Total RNA was isolated from cultured fibroblasts of the patient, and cDNA synthesis was performed as described⁸. The *GL* cDNA encompassing exons 3, 4, 5 and 6 was amplified using a forward primer within exon 3 (5'-CCTGACCTGCTTTGAACATAACC-3') and a reverse primer within exon 6 (5'-TGTCTTCCACCATTCATTCACG-3'), located 29 bp downstream of the stop codon in the 3' UTR, yielding a 469-bp

fragment. PCR conditions were as described²⁸ with a 60 °C annealing temperature.

Genbank accession numbers

Mouse grey-lethal cDNA, AF 533890; Human grey-lethal cDNA, AF 533891.

COMPETING INTERESTS STATEMENT

The authors declare that they have no competing financial interests.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank R. McInnes and J. Horsford for melan-a cells; S. Breton for V-ATPase antibodies; D. Bennett for discussion; D. Lohnes and R. Baron for critical reading of the manuscript; U. Ramenghi and families for their participation; J. Marcinkiewicz for advice; and H. Bernard for technical assistance. M.F. has studentship from the Fonds pour la Formation de Chercheurs et d'Aide à la Recherche (FCAR). This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research and by Hoechst Marion Roussel grant no. R97047 to J.V., partially supported by grant MIUR-FIRB #RBNE019J9W, and is manuscript #71 of the Genoma2000/ITB Project funded by Fondazione Cariplo.

REFERENCES

1. Karsenty, G. The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev.* 13, 3037-3051 (1999).
2. Teitelbaum, S.L. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289, 1504-1508 (2000).
3. Lazner, F., Gowen, M., Pavasovic, D. & Kola, I. Osteopetrosis and osteoporosis: two sides of the same coin. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1839-1846 (1999).
4. Reeves, J.D., August, C.S., Humbert, J.R. & Weston, W.L. Host defense in infantile osteopetrosis. *Pediatrics* 64, 202-206 (1979).
5. Wilson, C.J. & Vellodi, A. Autosomal recessive osteopetrosis: diagnosis, management, and outcome. *Arch. Dis. Child* 83, 449-452 (2000).
6. Gerritsen, E.J. *et al.* Bone marrow transplantation for autosomal recessive osteopetrosis. A report from the Working Party on Inborn Errors of the European Bone Marrow Transplantation Group. *J. Pediatr.* 125, 896-902 (1994).
7. Eapen, M., Davies, S.M., Ramsay, N.K. & Orchard, P.J. Hematopoietic stem cell transplantation for infantile osteopetrosis. *Bone Marrow Transplant.* 22, 941-946 (1998).
8. Frattini, A. *et al.* Defects in TCIRG1 subunit of the vacuolar proton pump are responsible for a subset of human autosomal recessive osteopetrosis. *Nat. Genet.* 25, 343-346 (2000).
9. Sobacchi, C. *et al.* The mutational spectrum of human malignant autosomal recessive osteopetrosis. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1767-1773 (2001).
10. Kornak, U. *et al.* Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell* 104, 205-215 (2001).
11. Tondravi, M.M. *et al.* Osteopetrosis in mice lacking haematopoietic transcription factor PU.1. *Nature* 386, 81-84 (1997).
12. Iotsova, V. *et al.* Osteopetrosis in mice lacking NF-kappaB1 and NF-kappaB2. *Nat. Med.* 3, 1285-1289 (1997).

13. Yoshida, H. *et al.* The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 345, 442-444 (1990).
14. Dai, X.M. *et al.* Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood* 99, 111-120 (2002).
15. Johnson, R.S., Spiegelman, B.M. & Papaioannou, V. Pleiotropic effects of a null mutation in the c-fos proto-oncogene. *Cell* 71, 577-586 (1992).
16. Wang, Z.Q. *et al.* Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos. *Nature* 360, 741-745 (1992).
17. Kong, Y.Y. *et al.* OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397, 315-323 (1999).
18. Begg, S.K. *et al.* Delayed hematopoietic development in osteopetrotic (op/op) mice. *J. Exp. Med.* 177, 237-242 (1993).
19. Thesingh, C.W. & Scherft, J.P. Fusion disability of embryonic osteoclast precursor cells and macrophages in the microphthalmic osteopetrotic mouse. *Bone* 6, 43-52 (1985).
20. Hodgkinson, C.A. *et al.* Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell* 74, 395-404 (1993).
21. Soriano, P., Montgomery, C., Geske, R. & Bradley, A. Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell* 64, 693-702 (1991).
22. Lomaga, M.A. *et al.* TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev.* 13, 1015-1024 (1999).
23. Li, Y.P., Chen, W., Liang, Y., Li, E. & Stashenko, P. Atp6i-deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification. *Nat. Genet.* 23, 447-451 (1999).
24. Scimeca, J.C. *et al.* The gene encoding the mouse homologue of the human osteoclast-specific 116-kDa V-ATPase subunit bears a deletion in osteosclerotic (oc/oc) mutants. *Bone* 26, 207-213 (2000).

25. Gruneberg, H. Grey-lethal, a new mutation in the house mouse. *J. Heredity* 27, 105-109 (1936).
26. Walker, D.G. Bone resorption restored in osteopetrotic mice by transplants of normal bone marrow and spleen cells. *Science* 190, 784-785 (1975).
27. Rajapurohitam, V. *et al.* The mouse osteopetrotic grey-lethal mutation induces a defect in osteoclast maturation/function. *Bone* 28, 513-523 (2001).
28. Vacher, J. & Bernard, H. Genetic localization and transmission of the mouse osteopetrotic grey-lethal mutation. *Mamm. Genome* 10, 239-243 (1999).
29. Chalhoub, N., Benachenhou, N. & Vacher, J. Physical and transcriptional map of the mouse Chromosome 10 proximal region syntenic to human 6q16-q21. *Mamm. Genome* 12, 887-892 (2001).
30. Zhang, Q.H. *et al.* Cloning and functional analysis of cDNAs with open reading frames for 300 previously undefined genes expressed in CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells. *Genome Res.* 10, 1546-1560 (2000).
31. Brown, D., Hirsch, S. & Gluck, S. Localization of a proton-pumping ATPase in rat kidney. *J. Clin. Invest* 82, 2114-2126 (1988).
32. Perou, C.M. *et al.* Identification of the murine beige gene by YAC complementation and positional cloning. *Nat. Genet.* 13, 303-308 (1996).
33. Baron, R., Neff, L., Louvard, D. & Courtoy, P.J. Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-kD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border. *J. Cell Biol* 101, 2210-2222 (1985).
34. Baron, R. *et al.* Polarized secretion of lysosomal enzymes: co-distribution of cation-independent mannose-6-phosphate receptors and lysosomal enzymes along the osteoclast exocytic pathway. *J. Cell Biol* 106, 1863-1872 (1988).
35. Blair, H.C., Teitelbaum, S.L., Ghiselli, R. & Gluck, S. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science* 245, 855-857 (1989).

36. Palokangas, H., Mulari, M. & Vaananen, H.K. Endocytic pathway from the basal plasma membrane to the ruffled border membrane in bone-resorbing osteoclasts. *J. Cell Sci.* 110, 1767-1780 (1997).
37. Vacher, J. & Tilghman, S.M. Dominant negative regulation of the mouse alpha-fetoprotein gene in adult liver. *Science* 250, 1732-1735 (1990).
38. Bennett, D.C., Cooper, P.J. & Hart, I.R. A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. *Int. J. Cancer* 39, 414-418 (1987).
39. Emerson, J.A., Vacher, J., Cirillo, L.A., Tilghman, S.M. & Tyner, A.L. The zonal expression of alpha-fetoprotein transgenes in the livers of adult mice. *Dev. Dyn.* 195, 55-66 (1992).
40. Marcinkiewicz, M., Savaria, D. & Marcinkiewicz, J. The pro-protein convertase PC1 is induced in the transected sciatic nerve and is present in cultured Schwann cells: comparison with PC5, furin and PC7, implication in pro-BDNF processing. *Mol. Brain Res.* 59, 229-246 (1998).

CHAPITRE IV
DISCUSSION

L'ostéopétrose autosomale récessive est une maladie génétique rare qui se caractérise par l'absence ou la perte d'activité des ostéoclastes, cellules spécialisées dans la résorption du tissu osseux. La rareté de la maladie nécessite le recours aux modèles animaux, en particulier la souris, pour l'élucidation des causes et des conséquences moléculaires et cellulaires de ce désordre squelettique. La souris grey-lethal (*gl*) est un modèle établi de l'ostéopétrose autosomale récessive dont le phénotype est très proche de celui observé dans la maladie infantile humaine: accumulation anormale du tissu osseux avec faible développement de la cavité médullaire, mort précoce et complémententation fonctionnelle après transfert de moelle osseuse.

L'objectif principal de mon projet de doctorat a été d'identifier le gène *gl* de souris et de le caractériser, dans le but d'isoler son homologue humain par la suite et confirmer son implication dans l'ostéopétrose récessive humaine. Le gène *gl* étant localisé sur le chromosome 10 de la souris, l'approche moléculaire utilisée a donc été le clonage positionnel. Une étape majeure dans la réalisation de ce projet a nécessité le raffinement de la carte génétique déjà établie (Vacher et Bernard, 1999) avant la construction de la carte physique de la région où est localisé le gène *gl*.

1) Raffinement de la carte génétique

Au moment où j'ai entamé ce projet, deux cartes génétiques étaient déjà établies, issues de deux croisements en retour entre la souris *gl/+*

hétérozygote et deux souris de souches différentes (*M. spretus* et *M.m.molossinus*) dont l'avantage principal est qu'elles sont polymorphiques pour les marqueurs disponibles dans la région du locus *gl* (Vacher et Bernard, 1999). Les deux premières cartes génétiques définissaient un intervalle génétique d'environ 1 cM pour la localisation de la mutation *gl*. Ce premier intervalle génétique était d'une distance raisonnable pour entamer la construction de la carte physique composée de clones de YACs, et était surtout défini grâce à la génération d'un recombinant de souris qui était présumément un double-recombinant (Vacher et Bernad, 1999). Cependant, une analyse plus approfondie et détaillée de tous les recombinants obtenus, incluant le double-recombinant, a révélé une probabilité quasi-négligeable pour ce double-recombinant et une probabilité plus forte pour un simple recombinant, suggérant une inversion dans l'ordre des deux groupes de marqueurs du croisement *M.m.molossinus* suivants: (*D10Mit215,54,Cd24a,55*) et (*D10Mit184,254,255,108,109,193*) qui étaient orientés centromériques-télomériques respectivement, sont maintenant orientés télomériques-centromériques respectivement. Cette rectification a résulté en un nouvel intervalle génétique d'environ 2 cM suite aux résultats combinés des deux croisements de souris (chapitre I, figure 12 comparée à la figure 2 et 3 de l'article (Vacher et Bernard, 1999)). Pour raffiner et délimiter la région du locus *gl*, un troisième croisement entre souris *gl/+* hétérozygotes (intercross) a été généré et a permis de réduire davantage l'intervalle génétique à environ 1 cM (appendice I,

tableau 1). Ce dernier croisement a confirmé l'ordre final des marqueurs utilisés lors des deux premiers croisements et l'état de la dernière carte génétique après modification (appendice I, tableau 1).

2) Carte physique et transcriptionnelle de clones contigus YACs

L'établissement de la carte physique de clones de YACs a été entamée afin de couvrir physiquement le premier intervalle génétique établi et publié et qui a été estimé à environ 1 cM. Cependant, comme expliqué précédemment, cet intervalle s'est avéré plutôt d'une distance estimée à environ 2 cM. L'avantage du choix des clones de YACs s'est avéré alors un choix important et fructueux dû principalement à la taille des inserts de ce type de clone qui varie en moyenne entre 500 kb et 800 kb, comparé aux autres clones (cosmides et autres) disponibles à cette époque. En effet, malgré le pourcentage élevé de chimérisme présent dans les YACs, un obstacle majeur surmonté par l'utilisation des hybrides somatiques spécifiques au chromosome 10 de souris, les YACs m'ont permis de couvrir la totalité de l'intervalle génétique de 2 cM dans un délai raisonnable et d'avoir une idée précise de la distance physique de la région candidate qui s'est avérée d'environ 8.5 Mb. En théorie, une distance génétique de 1 cM correspond à environ 1-2 Mb en distance physique. La taille de notre région physique candidate (~8.5 Mb) par rapport à son équivalent génétique (2 cM) s'explique par le peu de marqueurs utilisés qui représentaient les seuls disponibles dans la région du locus à cette époque, et par le nombre limité

de recombinants générés. D'où l'importance de générer des nouveaux marqueurs polymorphiques que j'ai isolés à partir des extrémités des inserts de YACs et qui m'ont permis de réduire davantage la taille de la région candidate (appendice I, tableau 1). L'établissement de cette carte physique m'a permis de confirmer l'ordre de tous les marqueurs cartographiant dans la région, mais surtout de confirmer leur orientation par rapport au centromère et d'entamer l'établissement de la carte transcriptionnelle.

La carte transcriptionnelle a été établie grâce aux données génétiques et physiques disponibles dans les banques informatiques publiques de séquences (Genbank, NCBI etc...) tant chez la souris que chez l'humain, et plus particulièrement l'humain dont le séquençage connaissait un progrès fulgurant. Cela m'a permis d'identifier des gènes et des ESTs localisés génétiquement dans la région candidate chez la souris ou par FISH dans la région synténique humaine en 6q16-q21, et de localiser et d'ordonner physiquement plusieurs de ces gènes et ESTs dans l'intervalle candidat ainsi que dans les régions flanquantes.

Le dernier croisement "intercross" de souris qui a été généré en parallèle à la construction de la carte physique de YACs, a eu un impact majeur sur la réduction à 1 cM de la région candidate pour *gl*. En effet, les recombinants ont été cartographiés physiquement avec beaucoup plus de précision en

utilisant de nouveaux marqueurs polymorphiques issus des extrémités des YACs, me permettant ainsi de définir physiquement la distance de la région candidate à environ 1 Mb (appendice I, tableau 1). Cela m'a permis d'exclure plusieurs gènes localisés à l'extérieur de cette région et de considérer ceux localisés à l'intérieur de cette région comme gènes candidats pour *gl*. De plus, la distance de 1 Mb est raisonnable pour être couverte par une dizaine de clones de BACs dont la taille moyenne est de 100 kb. Ces BACs me permettront de définir avec précision la taille de la région candidate puisque les BACs, à l'encontre des YACs, sont des clones stables et ne présentent pas ou peu de réarrangements, mais surtout ces BACs seront utilisés pour générer des souris transgéniques.

3) Carte physique et transcriptionnelle de clones contigus BACs

L'établissement de la carte physique de BACs fut entamé dans le but de couvrir la région candidate de 1 Mb définie à partir de la carte physique de YACs. Les marqueurs internes (*D10Mit108,184* et extrémités des inserts de YACs, etc...) ou flanquant (*D10Mit255* et *Cd24a*) la région candidate furent utilisés pour cribler la librairie génomique de BACs. Cependant, l'intervalle physique initial ne fut pas complètement couvert puisque de nouveaux marqueurs polymorphiques isolés des extrémités des inserts des clones de BACs ont permis de cartographier physiquement et avec précision les événements de recombinaison permettant ainsi de définir un nouvel intervalle non-recombinant d'environ 500 kb (appendice I, tableau

2). Cela m'a permis d'exclure certains gènes localisant à l'extérieur de la nouvelle région candidate et d'entamer la caractérisation de cette région afin d'identifier le gène *gl*. Quatre nouveaux gènes (*Lace1*, *Snx3*, *Nr2e1* et *Sec63*) furent identifiés et cartographiés dans la région candidate par homologie de séquence avec les extrémités des clones de BACs isolés lors de la marche chromosomique. *Snx3*, *Nr2e1* et *Sec63* représentaient des gènes localisés dans la région synténique humaine, alors que *Lace1* correspondait uniquement à des ESTs avant d'être publié chez la souris (Abrahams *et al.*, 2002). Cependant, aucun de ces gènes ne présentait un quelconque lien avec un phénotype osseux ou un phénotype pouvant être lié à l'ostéopétrose. Leur considération comme gènes candidats fut basée uniquement sur leur localisation physique dans la région candidate, sans exclure définitivement d'autres gènes inconnus ou non-identifiés dans cette région candidate.

4) Localisation fine du gène *gl* par complémentation fonctionnelle dans des souris BAC transgéniques

Pour caractériser en détail le contenu en gènes de l'intervalle non-recombinant, incluant des nouveaux gènes inconnus, j'ai opté pour un essai de complémentation fonctionnelle dans des souris BAC transgéniques. La nouvelle région candidate d'environ 500 kb étant couverte en quasi-totalité par trois clones de BACs (498E23, 373N3 et 343H5), ces derniers furent choisis pour la génération de souris transgéniques dans le but de vérifier si la correction des phénotypes de la souris *gl* pouvait être obtenue avec un de

ces clones. Effectivement, la pertinence du choix de cette procédure est basée sur la complémentation fonctionnelle de tous les phénotypes observés chez la souris mutante, soient la couleur du pelage et l'ostéopétrose, obtenue avec le BAC 373N3 (~180 kb). Ceci fut démontré par des analyses phénotypiques et histologiques. De plus, toutes les souris homozygotes *gl/gl* BAC transgéniques ont une durée de vie standard et se développent normalement. Les souris homozygotes *gl/gl* transgéniques pour le BAC 343H5 n'ont présenté aucune correction fonctionnelle bien que le gène *Sec63* soit exprimé, et par conséquent ont servi comme contrôle négatif, confirmant de plus que le gène *Sec63* présent dans ce BAC ne correspondait pas au gène *gl*. L'hypothèse émise fut donc que la mutation *gl* était liée à un nouveau gène inconnu présent dans le BAC 373N3.

5) Identification et caractérisation du gène *gl*

Pour caractériser le contenu en gène ou ESTs du BAC 373N3, un séquençage complet, devenu possible à cette époque, de ce BAC fut accompli et sa séquence comparée aux séquences disponibles dans les banques d'ESTs murins et humains. Plusieurs ESTs présentant de fortes homologies avec la séquence génomique du BAC furent identifiés, autant chez la souris que chez l'humain. Ces ESTs sont exprimés dans différents tissus, organes et lignées cellulaires, incluant les cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ (HSPC: Hematopoietic Stem/Progenitor Cells), corrélant avec le défaut hématopoïétique observé chez la souris *gl*.

L'implication d'un gène (HSPC019) fut confirmée par la démonstration de perte d'expression de ce transcrit chez la souris homozygote *gl/gl*. De plus, l'analyse du profil d'expression par Northern dans différents organes adultes et surtout dans les ostéoclastes et les mélanocytes en culture a permis de confirmer le rôle éventuel de ce gène dans le développement normal de ces cellules. Ce gène code pour un messager unique d'environ 3 kb dont l'expression est ubiquiste mais à des niveaux variables, étant la plus forte dans le cerveau, la rate, le rein, mais surtout dans les ostéoclastes et les mélanocytes. De plus, ce gène est exprimé dans les ostéoblastes responsables de la formation osseuse et qui sont impliqués dans la prolifération et la différenciation des ostéoclastes. Cependant, D.G. Walker a démontré *in vivo* qu'un transfert des cellules de la rate d'une souris *gl/gl* à une souris sauvage irradiée (ostéoblastes *+/+*) induit une ostéopétrose (Walker, 1975b), et inversement qu'un transfert de cellules de la rate d'une souris sauvage à une souris *gl/gl* irradiée (ostéoblastes *gl/gl*) corrige l'ostéopétrose (Walker, 1975a). Ces résultats démontrent *in vivo* que ce sont définitivement les précurseurs des ostéoclastes dans la rate qui sont responsables du phénotype ostéopétrotique chez la souris *gl* et non les ostéoblastes, malgré l'expression du gène *gl* dans ces derniers. De plus, des essais de coculture *in vitro* effectués dans notre laboratoire en utilisant des ostéoblastes *gl/gl* et des précurseurs ostéoclastiques isolés d'une rate *+/+*, ont permis de générer des ostéoclastes multinucléés en nombre standard. Ces essais de coculture *in vitro* confirment qu'une déficience en Gl dans les ostéoblastes n'a aucune

influence sur leur potentiel de supporter la prolifération et la différenciation des ostéoclastes, mais par contre n'indique pas si leur activité résorptive n'est pas affectée. Un test de "*pit assay*" sur ces ostéoclastes générés *in vitro* sera nécessaire pour vérifier leur activité résorptive, surtout que le défaut des ostéoclastes *gl/gl* est dans leur fonction résorptive et non pas dans leur prolifération ou différenciation.

5.1) Structure génomique du gène *gl*

L'isolement de l'ADN complémentaire (ADNc) pleine longueur de *gl* fut par la suite accompli afin de pouvoir élucider la structure génomique du gène *gl*. Par alignement de la séquence de l'ADNc contre la séquence génomique du BAC 373N3, la structure génomique fut élucidée (appendice II, tableau 1): le gène *gl* s'étend sur une distance génomique d'environ 23 kb, comprend six exons et cinq introns, avec un long 3'-UTR d'environ 2 kb. La région promotrice est dépourvue de boîte TATA et contient des sites consensus de liaison du facteur de transcription Sp1 qui sont conservés avec l'humain, ce qui explique l'expression ubiquiste de ce gène.

5.2) La mutation *gl*

Par des analyses de digestions enzymatiques et hybridation Southern avec des sondes correspondant à différentes régions de l'ADNc de *gl*, un réarrangement génomique majeur fut mis en évidence au niveau du locus *gl*. L'allèle *gl* est caractérisé par une délétion d'environ 7.5 kb qui élimine la

région promotrice, l'exon I et une partie de l'intron I, ce qui explique l'abolition complète de l'expression chez la souris homozygote *gl/gl*. La caractérisation plus détaillée de cette délétion par amplification des jonctions de la cassure d'ADN, a mis en évidence la présence d'un fragment de 460 pb correspondant à une portion 3'-UTR d'un élément répétitif de type LINE-1. Cette portion de l'élément LINE-1 s'aligne à 100% avec la séquence de l'élément répétitif retrouvé dans l'allèle *beige* d'un mutant de la souris et qui s'est avéré un élément retrotransposable actif (Perou *et al.*, 1996). Cependant, dans le cas de l'allèle *gl*, aucune séquence codante n'y est présente et les séquences répétées en tandem au niveau des points de cassure qui sont des caractéristiques d'un événement de retrotransposition n'ont pas été détecté. Ceci suggère que c'est plutôt une cassure au niveau de l'ADN génomique accompagnée d'une insertion d'un fragment de LINE-1 qui sont à l'origine de l'allèle *gl*. Quoiqu'il en soit, l'identification de cette délétion confirme que le gène affecté est certainement le gène *gl*. La présence de l'élément LINE-1 s'est avérée très utile puisque cela m'a permis de dériver un essai PCR spécifique à l'allèle *gl* pour pouvoir le différencier de l'allèle normale et ainsi de suivre la transmission de la mutation. Le maintien de la souche hétérozygote *gl/+* se fait ainsi sans risque de perdre cette délétion par un événement de recombinaison au niveau du locus *gl*. De plus, le génotypage peut se faire tôt au cours du développement, permettant une analyse prénatale du phénotype.

Une confirmation additionnelle de l'identification du gène *gl* est aussi venue de l'identification d'une lignée transgénique pour le BAC 373N3. Dans cette lignée, le BAC s'était intégré en une copie et a subi un réarrangement consistant en une délétion dans le gène *gl* et affectant la partie 3' du gène (en aval de l'exon 3). Cela a résulté en une absence de complémentation des phénotypes chez la souris homozygote *gl/gl* transgénique. Cette lignée récapitule les phénotypes de la souche *gl*, mais en présentant un nouvel allèle impliquant une anomalie génétique dans la région 3' du gène (au lieu de 5').

6) Profil d'expression au cours du développement et au stade adulte

L'analyse de l'expression du gène *gl* au cours du développement est venue appuyer les résultats obtenus suite à l'analyse de l'expression au stade adulte par Northern. Par contre, au stade embryonnaire, le seul moyen de vérifier l'expression de *gl* au niveau tissulaire était par hybridation *in situ* sur des coupes d'embryons à différents stades de développement, puisque les organes sont difficiles à isoler. Cette dernière analyse a révélé la forte expression du gène *gl* très tôt au niveau développemental (E12.5), en particulier cette expression est confinée au système nerveux central et au foie foetal dans lequel se trouvent les précurseurs hématopoïétiques à ce stade de développement. À rappeler qu'au jour embryonnaire 12.5, ni les ostéoblastes et ni les ostéoclastes ne sont encore formés. En fait, ces cellules commencent à être observés au jour embryonnaire 15.5 qui coïncide avec le

développement des premiers sites d'ossification. L'expression du gène *gl* devient plus prononcée et ubiquiste au jour embryonnaire 18.5 où on peut l'observer clairement au niveau des ostéoclastes des vertèbres, des côtes et de la mandibule (appendice III, figure 1), mais aussi dans le cerveau, l'intestin et le thymus. Au stade postnatal (en particulier P5 et P10), l'expression de *gl* au niveau de la peau coïncide avec l'expression du pigment au niveau des poils et est confinée aux cellules pigmentaires de la peau, soient les mélanocytes et non dans les kératinocytes (appendice III, figure 2). À noter qu'au stade adulte, l'expression devient ubiquiste mais toujours forte dans le cerveau, l'intestin, le thymus et les reins. Plus particulièrement pour le cerveau, l'expression la plus forte est observée dans le cervelet au niveau de la couche des cellules de Purkinje et dans l'hippocampe au niveau des cellules pyramidales et du dentus gyrus (appendice III, figure 3), suggérant un rôle important pour le gène *gl* dans le système neuronal qu'il sera intéressant d'explorer par des essais d'inactivation conditionnelle du gène *gl* dans ce tissu. De même, pour l'intestin où l'expression de *gl* est très forte et confinée aux villosités intestinales (appendice III, figure 4), il sera important d'analyser plus en détails un phénotype intestinal potentiel chez la souris homozygote *gl/gl*. Finalement, l'expression de *gl* dans le thymus, le rein et la rate, ainsi qu'à des niveaux plus faibles dans le foie, les poumons et le coeur semble confinée à des cellules ressemblant à des neutrophiles dans tous ces organes, excluant ainsi un rôle probable dans les hépatocytes et les cardiomyocytes.

Au niveau de la moelle osseuse, *gl* est aussi fortement exprimé dans des cellules ressemblant à des mégakaryocytes, suggérant un rôle potentiel dans la formation des plaquettes sanguines et dans la coagulation. La souris *gl/gl* présente une légère augmentation, non significative, du nombre des plaquettes sanguines, probablement due à une réponse compensatoire associée à un phénotype de coagulation diminuée très subtile et qui nécessite une analyse plus détaillée, par des cultures *in vitro* de mégakaryocytes *gl/gl* par exemple.

7) Structure et localisation sub-cellulaire de la protéine Gl

La séquence de l'ADNc du gène *gl* murin a révélé la présence d'une phase ouverte de lecture de 1014 nucléotides codant pour une protéine de 338 acides aminés possédant une masse théorique de 38 kD. L'analyse d'hydrophobicité de la protéine Gl a révélé la présence d'un domaine transmembranaire primaire dans la partie C-terminale et d'un peptide signal dans la partie N-terminale, suggérant une protéine transmembranaire de type I présentant théoriquement une partie C-terminal cytosolique et une partie N-terminal luminale. Cependant, l'analyse approfondie de la fonction de la protéine avec les programmes de prédiction de motifs protéiques n'a révélé aucun motif évident pouvant suggérer une fonction biochimique caractéristique ou assigner directement des partenaires protéiques. Donc, pour entamer l'analyse de cette protéine, il a été primordial de générer des anticorps spécifiques contre la protéine Gl

afin de pouvoir déterminer sa localisation sub-cellulaire. En effet, des anticorps ont été générés et ont permis de confirmer la masse protéique estimée à environ 34 kD de la protéine mature, c'est à dire la protéine clivée dépourvue du peptide signal, et de révéler la présence d'une autre bande correspondant probablement à des modifications post-traductionnelles de glycosylation qui étaient prévues puisque la protéine Gl renferme plusieurs sites prédits de glycosylation. Des inhibiteurs de glycosylation sont disponibles et pourraient confirmer cette hypothèse.

Par des études d'immunofluorescence sur des ostéoclastes isolés de l'os, la localisation sub-cellulaire de la protéine Gl s'est avérée cytosolique, suggérant que Gl serait associée avec la membrane des compartiments intracellulaires si le domaine transmembranaire prédit est fonctionnel. Ces résultats préliminaires semblent exclure la présence de la protéine Gl à la membrane plasmique. Cependant, ces études n'excluent pas la possibilité que Gl puisse y être recrutée lors de la résorption osseuse, en particulier au niveau de la bordure plissée. Pour vérifier cette hypothèse, il serait essentiel de faire la même étude sur des ostéoclastes cultivés sur de la dentine, ainsi qu'avec des anticorps purifiés pour avoir une meilleure résolution de l'identité des compartiments intracellulaires.

8) Conservation de la protéine Gl au cours de l'évolution

L'importance évidente de la protéine Gl se manifeste par sa forte conservation au cours de l'évolution chez les vertébrés, plus précisément chez le poisson zèbre (*Danio rerio*), le fugu (*Takifugu rubripes*), le xénope (*Xenopus laevis*), le poulet (*Gallus gallus*) et bien sûr le rat (*Rattus norvegicus*) et l'humain (*Homo sapiens*) (appendice IV, figure 1). Chez les espèces les plus éloignées de la souris, poisson zèbre et fugu, cette conservation est flagrante dans la partie C-terminale de la protéine incluant le domaine transmembranaire, suggérant fortement que ce domaine est fonctionnel. Une recherche par BLAST (basic local alignment search tool) contre les banques protéiques de la drosophile (*Drosophila melanogaster*), du nématode (*Caenorhabditis elegans*) et de l'anophèle (*Anopheles gambiae*) résulte dans la caractérisation d'une protéine de faible homologie pour chacune des espèces, et cette faible homologie correspond dans les trois cas aux résidus de cystéines qui semblent indiquer un certain rôle dans la fonction de la protéine Gl, puisque cette dernière est riche en ces résidus. Cependant chez les organismes eucaryotes unicellulaires, comme la levure, aucune homologie avec la protéine Gl n'a été détectée, suggérant une conservation spécifique aux organismes multicellulaires.

La forte homologie de la protéine Gl de souris avec la protéine humaine (334 acides aminés) qui présente ~83% de similarité incluant le peptide signal et le domaine transmembranaire, suggère une fonction similaire dans

les deux espèces. Basé sur cette similitude, l'hypothèse émise fut qu'une déficience de cette protéine pourrait être probablement responsable du développement de l'ostéopétrose chez l'humain.

9) Le gène *GL* humain et l'ostéopétrose autosomale récessive infantile maligne

L'identification du gène *gl* chez la souris m'a permis d'isoler son homologue *GL* humain au moment où le séquençage du génome humain était en progression, la région synténique humaine 6q16-q21 étant presque complètement caractérisée avec plusieurs BACs et PACs séquencés dont un contenait la totalité du gène *GL* ou *HSPC019* humain. Cela m'a permis d'élucider la structure génomique du gène humain par alignement contre l'ADNc de souris ou des ESTs humains (appendice II, tableau 2). Le gène *GL* s'est avéré bien conservé avec le gène de souris au niveau nucléotidique, en particulier dans les régions codantes, les régions 5'-UTR et 3'-UTR, et les sites d'épissage donneurs et accepteurs. Le gène *GL* présente la même structure génomique que son homologue de souris, avec six exons, cinq introns et un long 3'-UTR d'environ 2 kb (appendice II, tableau 2). L'identification du gène *GL* humain m'a permis de procéder à la recherche de mutations chez des patients atteints de l'ostéopétrose autosomale récessive (ARO) (appendice V, tableau 1).

Les résultats de mes travaux de doctorat ont démontré pour la première

fois qu'une mutation dans le gène *GL* est associée avec l'ostéopétrose autosomale récessive infantile maligne. Dix-neuf patients ostéopétrotiques, ne présentant aucune anomalie génétique dans les gènes *TCIRG1* et *CLCN7*, ont été analysés plus en détails pour la présence de mutations dans le gène *GL*. Une mutation fut identifiée et implique une substitution G→A à la position +5 du site donneur d'épissage de l'intron V. Le patient est homozygote pour cette mutation, alors que ses parents asymptomatiques sont hétérozygotes, corrélant ainsi génotype et phénotype récessif. De plus, le séquençage des régions non-codantes (5'-UTR et 3'-UTR), ainsi que des régions introniques flanquant les exons du gène n'ont démontré aucun polymorphisme entre ses deux allèles, suggérant fortement que le patient était issu d'un mariage consanguin, ce qui est une pratique courante dans la population (italienne, communauté gypsy) d'où le patient prend son origine. Cette consanguinité a été confirmée par le médecin suivant la famille.

Cette nouvelle mutation affecte le site donneur d'épissage à la position +5 et est la première à être décrite chez un patient ostéopétrotique, bien que d'autres mutations affectant les sites d'épissage à d'autres positions sont prédominantes dans le gène *TCIRG1* (Sobacchi *et al.*, 2001). Il est documenté que des mutations altérant la séquence consensus GURAGU du site donneur d'épissage résulte en un épissage aberrant impliquant l'exclusion d'un exon (Demir *et al.*, 2002; Pohlenz *et al.*, 2002; Rees *et al.*, 2002). Cela empêche la définition exonique et l'assemblage du spliceosome

(Chabot, 1996). L'hypothèse émise fut que l'exclusion d'un exon serait le mécanisme induisant la déficience en Gl chez ce patient. Pour confirmer cette hypothèse, j'ai procédé par RT-PCR afin de caractériser les transcrits *GL* chez ce patient à partir d'ARN isolé d'une lignée fibroblastique dérivée d'une biopsie effectuée sur le patient. Deux produits d'amplification correspondant à des transcrits aberrants furent détectés, tous les deux dépourvus de l'exon 5 du gène *GL*. De plus, le produit majoritaire contenait un fragment de l'intron IV correspondant à l'usage de sites accepteur et donneur cryptiques d'épissage qui ressemblaient aux séquences consensus des sites normaux (chaîne de pyrimidine-NCAG: 3' et GURAGU: 5'). La proportion inégale entre les deux transcrits aberrants s'explique par la distance entre le site donneur de l'exon 4 et le site accepteur de l'exon 6, rendue très large par l'exclusion de l'exon 5. Cela favorise alors le site accepteur cryptique proximal dans l'intron IV. L'exclusion exonique fut aussi reproduite dans un essai *in vitro* d'épissage qui a résulté en deux transcrits aberrants dépourvus de l'exon 5 (appendice V, figure 1). Le fait que l'on puisse détecter les transcrits aberrants chez le patient indique que ces transcrits sont stables et que la synthèse des protéines correspondantes puisse avoir lieu. Cependant, ces protéines seraient non fonctionnelles puisqu'elles seraient dépourvues de la partie C-terminale de Gl, incluant le domaine transmembranaire, et par conséquent leurs localisation et stabilité seront affectées; cette région représente la partie la plus conservée de Gl chez différentes espèces au cours de l'évolution. De plus, ces protéines

aberrantes n'auront aucun effet dominant négatif, puisque les parents hétérozygotes sont asymptomatiques.

Le patient présentant une mutation dans *GL* est décédé à l'âge de un mois, indiquant que des mutations de perte de fonction dans le gène *GL* résulteraient en un phénotype létal sévère similaire à celui de la souris *gl*. Cela expliquerait pourquoi une mutation seulement fut identifiée chez dix-neuf patients testés. Des mutations de perte de fonction dans le gène *GL* pourraient causer une mort prénatale ou périnatale chez les individus affectés. Cela pourrait prévaloir chez la souris *gl* où un seul allèle a été décrit jusqu'à maintenant. Donc, en comparaison avec les mutations affectant le gène *TCIRG1*, l'ostéopétrose infantile maligne associée à des mutations dans *GL* est vraisemblablement plus sévère et par conséquent moins fréquemment détectée. Ceci est confirmé chez la souris où il y a un déficit dans la génération d'homozygotes (7% au lieu de 25% selon le ratio Mendélien) (Vacher *et al.*, 1999), indiquant une mort *in utero*. Une hypothèse additionnelle impliquerait des formes intermédiaires ou bénignes de l'ostéopétrose causées par des mutations missenses dans le gène *GL*, comme fut le cas pour *CLCN7* dans lequel des mutations ont été associées avec l'ostéopétrose autosomale récessive intermédiaire (Campos-Xavier *et al.*, 2003) et l'ostéopétrose autosomale dominante de type II (Cleiren *et al.*, 2001). De plus, je ne peux pas exclure la présence de mutations dans les régions régulatrices promotrices ou introniques du gène *GL* qui pourraient

être associées à la maladie chez les autres patients de notre échantillon.

Le modèle ostéopétritique *gl* présente aussi un phénotype de couleur du pelage dû à un rôle fonctionnel potentiel de la protéine Gl dans l'activité des mélanocytes. Il serait intéressant d'identifier des patients ostéopétritiques avec une déficience en Gl mais présentant des symptômes cliniques au niveau de leur pigmentation. Cela permettrait la définition d'une nouvelle forme d'ostéopérose humaine et par conséquent un diagnostic clinique plus précis. De plus, il serait intéressant de reproduire la mutation humaine chez la souris afin de mieux étudier ces conséquences phénotypiques (ostéopérose et couleur du pelage) et moléculaires (protéine). Ceci résultera en un nouvel allèle induit du gène *gl* chez la souris qui, à priori, devrait reproduire les mêmes effets que l'allèle *gl* natif.

L'identification de la mutation dans le gène *GL* et la confirmation de son implication dans l'ostéopérose humaine ont permis de démontrer pour la première fois la présence d'un nouveau locus en 6q21 associé à une forme sévère d'ostéopérose autosomale récessive infantile maligne. Cela m'a permis par la suite de dériver un essai PCR sûr, rapide et spécifique afin de dépister génétiquement la présence de la mutation chez d'autres membres ou proches de la famille, mais surtout pour permettre un diagnostic prénatal dans le but de confirmer les analyses radiologiques ou par ultrasons qui sont sujettes à des erreurs d'interprétation. De plus, cela

permettra surtout dans le cas d'un foetus diagnostiqué homozygote pour la mutation *GL*, soit de procéder à un avortement tôt pendant la grossesse pour éviter tout risque, soit d'intervenir *in utero* par transfusion sanguine et immédiatement après la naissance par transplantation de moelle qui est plus efficace si effectuée à un jeune âge. En effet, cet essai PCR fut établi en prenant avantage du nouveau site de restriction (*Apo I*) introduit par la mutation (appendice V, figure 2b). Le conseil génétique fut donc établi pour l'oncle du patient qui s'est avéré hétérozygote pour la même mutation et donc asymptomatique; sa femme, avec qui il a un lien de parenté, s'est avérée non-porteuse. Pour ce couple, une descendance non atteinte est assurée, avec une possibilité d'hériter d'un seul allèle muté du père (appendice V, figure 2a). De même, le diagnostic prénatal fut accompli sur un foetus âgé d'environ 12 semaines. L'ADN a été extrait à partir du placenta, plus particulièrement des cellules trophoblastiques dont l'avantage principal est qu'elles sont dépourvues des cellules de la mère. Le foetus s'est avéré porteur de deux formes alléliques *GL* non mutés (appendice V, figure 2a), et la naissance d'un garçon sain dépourvu d'ostéopétrose s'est faite récemment. Le cordon ombilical de ce nouveau-né est riche en cellules souches hématopoïétiques et donc représente une source importante de précurseurs ostéoclastiques. Cela pourrait servir dans le futur pour une transplantation de moelle chez un foetus diagnostiqué homozygote pour la mutation *GL*.

10) Fonction spéculative de la protéine Gl

En analysant les deux phénotypes majeurs de la souris *gl*, soit l'ostéopétrose impliquant un défaut au niveau de la résorption osseuse dû à un sous développement de la bordure plissée des ostéoclastes et la couleur du poil qui implique un transport du pigment jaune dans les mélanocytes, puis dans les kératinocytes, il est évident qu'une fonction commune de Gl dans les deux types cellulaires serait à l'origine de ces deux phénotypes.

Dans le cas des ostéoclastes, la bordure plissée est formée de la fusion des vésicules intracellulaires, principalement les lysosomes et les vésicules sécrétrices. Donc, un défaut de recrutement de ces organelles intracellulaires à la membrane apicale pourrait affecter le développement de cette bordure plissée. Cela exige un trafic vésiculaire régulé qui implique le réarrangement du cytosquelette dans les ostéoclastes. Le cytosquelette des ostéoclastes *gl/gl* est désorganisé (Rajapurohitam *et al.*, 2001), suggérant un rôle de Gl dans le trafic vésiculaire. Cette désorganisation du cytosquelette dans les ostéoclastes *gl/gl*, affecterait le transport des vésicules sécrétrices d'enzymes (protéinases et métalloprotéases) et d'ions (H^+ et Cl^-) vers les lacunes de résorption au niveau de la bordure plissée. Ceci affecterait aussi le transport des vésicules lysosomales, contenant la matrice dégradée, de la membrane apicale (bordure plissée) vers la membrane basolatérale après endocytose-transcytose-exocytose. Ces vésicules voyagent le long des microtubules du cytosquelette.

Dans le cas du phénotype de couleur du poil, le transport du pigment pheomélanine (jaune) par les mélanosomes dans les mélanocytes puis dans les kératinocytes semble affecté. Les mélanocytes forment une unité composée d'un mélanocyte et de 30-40 keratinocytes (Seiberg, 2001). En réponse à des irradiations par les ultraviolets, les mélanocytes prolongent leurs dendrites riches en filaments d'actine et en microtubules pour permettre le transport et le transfert des organelles pigmentaires appelées mélanosomes aux kératinocytes adjacents. Cela forme un écran protégeant le noyau contre les radiations ultravioletes (Scott, 2002). Les mélanosomes sont transportés le long des microtubules où ils sont captés à l'extrémité des dendrites par une action coordonnée de la myosine Va, Rab27a et la mélanophiline (Langford, 2002). Dans les mélanocytes *gl*, on peut imaginer un scénario où une perturbation du trafic vésiculaire des mélanosomes serait à l'origine de l'absence du pigment jaune dans les kératinocytes, impliquant là aussi une réorganisation du cytosquelette.

La localisation cytosolique de la protéine Gl corrobore les observations sus-mentionnées et suggère que Gl pourrait être présente dans la membrane des vésicules intracellulaires où elle contrôlerait le trafic vésiculaire le long du cytosquelette. Des essais de colocalisation par immunofluorescence pourraient clarifier ce modèle. De plus des analyses de double-hybrides permettraient d'identifier les partenaires protéiques potentiels de Gl, ce qui pourrait donner une idée plus précise sur la fonction de la protéine.

Au sujet de la fonction biochimique de Gl, son expression dans plusieurs tissus démontrée uniquement au niveau transcriptionnel, ainsi que sa conservation au cours de l'évolution jusqu'à *C. elegans* laissent présager une fonction commune qui n'est pas uniquement confinée au système osseux. En effet, au cours de la rédaction de cette thèse, une fonction fut proposée pour Gl basée sur un motif "RING FINGER" présent dans la protéine mais qui diverge de la séquence consensus qui est bien conservée chez d'autres protéines (Fischer *et al.*, 2003). Ces motifs ont souvent été associés à des protéines possédant une fonction de ligase d'ubiquitination impliquée dans la dégradation des protéines par le protéasome. Les auteurs de cet article identifient par double-hybride dans le cerveau une protéine GIPN (GAIP interacting protein N terminus) (équivalent de Gl), et présentent des évidences démontrant l'activité ligase pour l'ubiquitine E3 de cette protéine. De plus, les auteurs démontrent une activité d'ubiquitination contre la protéine elle-même, et contre G α i3 qui appartient à la famille des petites protéines G impliquées dans la transduction des signaux issus des GPCR (G Protein Coupled Receptors) (Fischer *et al.*, 2003).

Dans la lumière de ces résultats récents, Gl jouerait un rôle dans la dégradation de différentes protéines. Ces protéines qui pourraient être identifiées par double-hybride, auraient une expression tissulaire plus spécifique et seraient associées aux différents phénotypes de la souris *gl*.

11) Ostéopétrose chez la souris vs ostéopétrose humaine

La souris s'est avérée un outil remarquable et très utile pour l'étude des maladies génétiques rares comme l'ostéopétrose. Cela a permis une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans cette maladie, ainsi que dans la régulation de l'homéostasie osseuse. En particulier, l'identification des facteurs essentiels à la prolifération et la différenciation des ostéoclastes (M-CSF, RANKL, RANK et OPG) fut réalisée en étudiant des modèles spontanés (M-CSF), induits (RANKL et RANK) ou transgéniques (OPG) d'ostéopétrose chez la souris. Pour tous ces facteurs, aucune mutation n'a été décrite chez des patients ostéopétrotiques, à l'exception de RANK et OPG dans lesquels des mutations furent associées avec le développement d'une forme d'ostéoporose et par conséquent impliqués dans l'homéostasie osseuse. À noter que tous ces modèles murins présentent une ostéopétrose récessive, spontanée ou induite, et favorisée par des croisements frère/soeur contrôlés; la probabilité que deux allèles soient affectés chez l'humain est très rare et souvent associée aux mariages consanguins. Une autre explication suggérerait que la fonction de ces gènes est vitale, et qu'une invalidation des deux allèles engendrerait un phénotype très sévère et une mort *in utero*. Ceci s'applique aussi pour des gènes impliqués dans l'activité résorptive des ostéoclastes (*CLCN7* et *GL*). Des mutations récessives ont été décrites dans *CLCN7* seulement chez deux patients atteints de l'ostéopétrose infantile récessive sévère, alors que des mutations furent décrites dans plusieurs cas

d'ostéopétrose dominante bénigne. De même pour *GL* où une seule mutation récessive fut décrite jusqu'à maintenant. Chez la souris hétérozygote *Clcn7^{+/-}*, aucun phénotype d'ostéopétrose bénigne fut reporté, suggérant ainsi que l'humain est plus sensible à des mutations dominantes que la souris, et que des mutations récessives seraient très sévères, souvent létales et indétectables chez l'humain.

En analysant les mutations décrites dans l'ostéopétrose humaine, on s'aperçoit que celles-ci surviennent dans des gènes (*GL*, *TCIRG1*, *CLCN7*) impliqués dans l'activité résorptive des ostéoclastes et non dans des gènes essentiels à leur prolifération et différenciation. Une explication à cela serait purement spéculative et suggérerait que les gènes impliqués dans la prolifération et différenciation des ostéoclastes sont plus essentiels et vitaux chez l'humain, chez qui une déficience en ces facteurs serait létale *in utero* et donc plus sévère que chez la souris.

Finalement, plusieurs cas d'ostéopétrose chez l'humain demeurent toujours inexplicés ou associés génétiquement à des mutations. Cette proportion qui est d'environ 50% suggère que d'autres gènes non-identifiés pourraient y être associée. Ces gènes pourraient faire partie d'une même voie de signalisation ou être des partenaires d'interaction avec les gènes déjà identifiés et impliqués dans l'ostéopétrose.

CONCLUSION

Le modèle *gl* d'ostéopétrose a confirmé encore une fois la pertinence des modèles animaux, en particulier chez la souris, pour l'identification des gènes impliqués dans des maladies génétiques rares où il est impossible d'avoir plusieurs familles atteintes et donc pratiquement impossible de procéder à leur identification directe chez les humains. Cela confirme la proximité entre la génétique de la souris et celle de l'humain.

L'approche de clonage positionnel s'est avérée très utile. En effet, aucun des gènes localisés dans la région candidate pour *gl* et dont la fonction était connue ne correspondait au gène *gl*. Donc, une approche de clonage fonctionnel n'aurait eu aucun impact, et n'aurait pas abouti à l'identification du gène *gl*.

De plus, comme le gène *gl* s'est avéré un nouveau gène inconnu pour lequel uniquement des ESTs étaient disponibles et donc la taille de son locus indéterminée, son identification n'aurait pas pu être réalisée sans une complémentation fonctionnelle avec un BAC. L'avantage principal de l'utilisation des clones de BAC pour la génération des souris transgéniques est que ces clones couvrent en moyenne un étendu génomique de 100 kb et incluent vraisemblablement toutes les séquences régulatrices. De plus, les données informatiques des séquences publiques prédisaient un pseudogène correspondant à ces ESTs et par conséquent ce présumé pseudogène

n'aurait jamais été considéré comme candidat pour *gl*. Donc, la correction des phénotypes *gl* dans des souris BAC transgéniques est venue contredire cette dernière possibilité et confirmer que c'était bel et bien le gène *gl*.

La caractérisation de la protéine Gl a révélé une nouvelle fonction essentielle à l'activité de deux types cellulaires d'origine différente, soient les ostéoclastes et les mélanocytes. Cependant la fonction précise de cette nouvelle protéine reste à élucider, ce qui est maintenant possible avec l'identification du gène et fera l'objet des projets futurs du laboratoire.

BIBLIOGRAPHIE

1. Abrahams,B.S., Mak,G.M., Berry,M.L., Palmquist,D.L., Saionz,J.R., Tay,A., Tan,Y.H., Brenner,S., Simpson,E.M., and Venkatesh,B. (2002). Novel vertebrate genes and putative regulatory elements identified at kidney disease and NR2E1/fierce loci. *Genomics*, 80, 45-53.
2. Acampora,D., Merlo,G.R., Paleari,L., Zerega,B., Postiglione,M.P., Mantero,S., Bober,E., Barbieri,O., Simeone,A., and Levi,G. (1999). Craniofacial, vestibular and bone defects in mice lacking the Distal-less-related gene *Dlx5*. *Development*, 126, 3795-3809.
3. Amling,M., Neff,L., Priemel,M., Schilling,A.F., Rueger,J.M., and Baron,R. (2000). Progressive increase in bone mass and development of odontomas in aging osteopetrotic c-src-deficient mice. *Bone*, 27, 603-610.
4. Arai,F., Miyamoto,T., Ohneda,O., Inada,T., Sudo,T., Brasel,K., Miyata,T., Anderson,D.M., and Suda,T. (1999). Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) receptors. *J. Exp. Med.*, 190, 1741-1754.
5. Baron,R., Neff,L., Brown,W., Courtoy,P.J., Louvard,D., and Farquhar,M.G. (1988). Polarized secretion of lysosomal enzymes: co-distribution of cation-independent mannose-6-phosphate receptors and lysosomal enzymes along the osteoclast exocytic pathway. *J. Cell Biol*, 106, 1863-1872.
6. Baron,R., Neff,L., Louvard,D., and Courtoy,P.J. (1985). Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-kD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border. *J. Cell Biol*, 101, 2210-2222.
7. Baron,R., Neff,L., Roy,C., Boisvert,A., and Caplan,M. (1986). Evidence for a high and specific concentration of (Na⁺,K⁺)ATPase in the plasma membrane of the osteoclast. *Cell*, 46, 311-320.
8. Barsh,G.S. (1996). The genetics of pigmentation: from fancy genes to complex traits. *Trends Genet.*, 12, 299-305.

9. Begg,S.K. and Bertonecello,I. (1993). The hematopoietic deficiencies in osteopetrotic (op/op) mice are not permanent, but progressively correct with age. *Exp. Hematol.*, 21, 493-495.
10. Benichou,O.D., Laredo,J.D., and de Vernejoul,M.C. (2000). Type II autosomal dominant osteopetrosis (Albers-Schonberg disease): clinical and radiological manifestations in 42 patients. *Bone*, 26, 87-93.
11. Blair,H.C., Teitelbaum,S.L., Ghiselli,R., and Gluck,S. (1989). Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science*, 245, 855-857.
12. Blair,H.C., Teitelbaum,S.L., Tan,H.L., Koziol,C.M., and Schlesinger,P.H. (1991). Passive chloride permeability charge coupled to H(+)-ATPase of avian osteoclast ruffled membrane. *Am. J. Physiol.*, 260, C1315-C1324.
13. Boissy,P., Malaval,L., and Jurdic,P., Koziol,C.M. (2000). Ostéoblastes et ostéoclastes: une coopération exemplaire entre cellules mésenchymateuses et cellules hématopoïétiques. *Hématologie*, 6, 6-16.
14. Bollerslev,J. and Andersen,P.E., Jr. (1988). Radiological, biochemical and hereditary evidence of two types of autosomal dominant osteopetrosis. *Bone*, 9, 7-13.
15. Bonnelye,E., Merdad,L., Kung,V., and Aubin,J.E. (2001). The orphan nuclear estrogen receptor-related receptor alpha (ERRalpha) is expressed throughout osteoblast differentiation and regulates bone formation in vitro. *J. Cell Biol.*, 153, 971-984.
16. Bonyadi,M., Waldman,S.D., Liu,D., Aubin,J.E., Grynpas,M.D., and Stanford,W.L. (2003). Mesenchymal progenitor self-renewal deficiency leads to age-dependent osteoporosis in Sca-1/Ly-6A null mice. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100, 5840-5845.
17. Boyle,W.J., Simonet,W.S., and Lacey,D.L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423, 337-342.
18. Bucay,N., Sarosi,I., Dunstan,C.R., Morony,S., Tarpley,J., Capparelli,C., Scully,S., Tan,H.L., Xu,W., Lacey,D.L., Boyle,W.J., and Simonet,W.S. (1998). osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.*, 12, 1260-1268.

19. Campos-Xavier,A.B., Saraiva,J.M., Ribeiro,L.M., Munnich,A., and Cormier-Daire,V. (2003). Chloride channel 7 (CLCN7) gene mutations in intermediate autosomal recessive osteopetrosis. *Hum. Genet.*, 112, 186-189.
20. Chabot,B. (1996). Directing alternative splicing: cast and scenarios. *Trends Genet.*, 12, 472-478.
21. Chatterjee,D., Chakraborty,M., Leit,M., Neff,L., Jamsa-Kellokumpu,S., Fuchs,R., and Baron,R. (1992). Sensitivity to vanadate and isoforms of subunits A and B distinguish the osteoclast proton pump from other vacuolar H⁺ ATPases. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89, 6257-6261.
22. Chellaiah,M., Kizer,N., Silva,M., Alvarez,U., Kwiatkowski,D., and Hruska,K.A. (2000). Gelsolin deficiency blocks podosome assembly and produces increased bone mass and strength. *J Cell Biol.*, 148, 665-678.
23. Cheow,H.K., Steward,C.G., and Grier,D.J. (2001). Imaging of malignant infantile osteopetrosis before and after bone marrow transplantation. *Pediatr. Radiol.*, 31, 869-875.
24. Cleiren,E., Benichou,O., Van Hul,E., Gram,J., Bollerslev,J., Singer,F.R., Beaverson,K., Aledo,A., Whyte,M.P., Yoneyama,T., deVernejoul,M.C., and van Hul,W. (2001). Albers-Schonberg disease (autosomal dominant osteopetrosis, type II) results from mutations in the CLCN7 chloride channel gene. *Hum. Mol. Genet.*, 10, 2861-2867.
25. Cundy,T., Hegde,M., Naot,D., Chong,B., King,A., Wallace,R., Mulley,J., Love,D.R., Seidel,J., Fawkner,M., Banovic,T., Callon,K.E., Grey,A.B., Reid,I.R., Middleton-Hardie,C.A., and Cornish,J. (2002). A mutation in the gene TNFRSF11B encoding osteoprotegerin causes an idiopathic hyperphosphatasia phenotype. *Hum. Mol. Genet.*, 11, 2119-2127.
26. Dai,X.M., Ryan,G.R., Hapel,A.J., Dominguez,M.G., Russell,R.G., Kapp,S., Sylvestre,V., and Stanley,E.R. (2002). Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood*, 99, 111-120.

27. Delany,A.M., Amling,M., Priemel,M., Howe,C., Baron,R., and Canalis,E. (2000). Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice. *J. Clin. Invest*, 105, 915-923.
28. Demir,E., Sabatelli,P., Allamand,V., Ferreiro,A., Moghadaszadeh,B., Makrelouf,M., Topaloglu,H., Echenne,B., Merlini,L., and Guicheney,P. (2002). Mutations in COL6A3 cause severe and mild phenotypes of Ullrich congenital muscular dystrophy. *Am J Hum. Genet.*, 70, 1446-1458.
29. Dougall,W.C., Glaccum,M., Charrier,K., Rohrbach,K., Brasel,K., De Smedt,T., Daro,E., Smith,J., Tometsko,M.E., Maliszewski,C.R., Armstrong,A., Shen,V., Bain,S., Cosman,D., Anderson,D., Morrissey,P.J., Peschon,J.J., and Schuh,J. (1999). RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev.*, 13, 2412-2424.
30. Ducy,P., Amling,M., Takeda,S., Priemel,M., Schilling,A.F., Beil,F.T., Shen,J., Vinson,C., Rueger,J.M., and Karsenty,G. (2000a). Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*, 100, 197-207.
31. Ducy,P., Schinke,T., and Karsenty,G. (2000b). The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*, 289, 1501-1504.
32. Duong,L.T. and Rodan,G.A. (2001). Regulation of osteoclast formation and function. *Rev. Endocr. Metab Disord.*, 2, 95-104.
33. Erlebacher,A. and Derynck,R. (1996). Increased expression of TGF-beta 2 in osteoblasts results in an osteoporosis-like phenotype. *J. Cell Biol*, 132, 195-210.
34. Fischer,R., De Vries,L., Meerloo,T., and Farquhar,M.G. (2003). Promotion of G*α*i3 subunit down-regulation by GIPN, a putative E3 ubiquitin ligase that interacts with RGS-GAIP. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100, 8270-8275.
34. Franceschi,R.T. (1999). The developmental control of osteoblast-specific gene expression: role of specific transcription factors and the extracellular matrix environment. *Crit Rev. Oral Biol. Med.*, 10, 40-57.

35. Franzoso,G., Carlson,L., Xing,L., Poljak,L., Shores,E.W., Brown,K.D., Leonardi,A., Tran,T., Boyce,B.F., and Siebenlist,U. (1997). Requirement for NF-kappaB in osteoclast and B-cell development. *Genes Dev.*, 11, 3482-3496.
36. Gardiner,E.M., Baldock,P.A., Thomas,G.P., Sims,N.A., Henderson,N.K., Hollis,B., White,C.P., Sunn,K.L., Morrison,N.A., Walsh,W.R., and Eisman,J.A. (2000). Increased formation and decreased resorption of bone in mice with elevated vitamin D receptor in mature cells of the osteoblastic lineage. *FASEB J.*, 14, 1908-1916.
37. Gehron,R.P. (1989). The biochemistry of bone. *Endocrinol Metab Clin. North Am.*, 18, 858-902.
38. Gelb,B.D., Shi,G.P., Chapman,H.A., and Desnick,R.J. (1996). Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science*, 273, 1236-1238.
39. Gerritsen,E.J., Vossen,J.M., Fasth,A., Friedrich,W., Morgan,G., Padmos,A., Vellodi,A., Porras,O., O'Meara,A., Porta,F., and . (1994a). Bone marrow transplantation for autosomal recessive osteopetrosis. A report from the Working Party on Inborn Errors of the European Bone Marrow Transplantation Group. *J. Pediatr.*, 125, 896-902.
40. Gerritsen,E.J., Vossen,J.M., van Loo,I.H., Hermans,J., Helfrich,M.H., Griscelli,C., and Fischer,A. (1994b). Autosomal recessive osteopetrosis: variability of findings at diagnosis and during the natural course. *Pediatrics*, 93, 247-253.
41. Goltzman,D. (2002). Discoveries, drugs and skeletal disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 1, 784-796.
42. Grigoriadis,A.E., Wang,Z.Q., Cecchini,M.G., Hofstetter,W., Felix,R., Fleisch,H.A., and Wagner,E.F. (1994). c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science*, 266, 443-448.
43. Grüneberg,H. (1935). A new sub-lethal colour mutation in the house mouse. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol)*, 118, 321-342.
44. Grüneberg,H. (1936). Grey-lethal, a new mutation in the house mouse. *J Hered.*, 27, 105-109.

45. Grüneberg,H. (1938). Some new data on the grey-lethal mouse. *J Genet.*, 36, 153-170.
46. Hay,E., Lemonnier,J., Modrowski,D., Lomri,A., Lasmoles,F., and Marie,P.J. (2000). N- and E-cadherin mediate early human calvaria osteoblast differentiation promoted by bone morphogenetic protein-2. *J. Cell Physiol*, 183, 117-128.
47. Hayman,A.R., Jones,S.J., Boyde,A., Foster,D., Colledge,W.H., Carlton,M.B., Evans,M.J., and Cox,T.M. (1996). Mice lacking tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) have disrupted endochondral ossification and mild osteopetrosis. *Development*, 122, 3151-3162.
48. Hodgkinson,C.A., Moore,K.J., Nakayama,A., Steingrimsson,E., Copeland,N.G., Jenkins,N.A., and Arnheiter,H. (1993). Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell*, 74, 395-404.
49. Hollinshead,M.B., Schneider,L.C., and Smith,M.E. (1975). Prenatal development of the grey lethal mouse. I. Teeth and jaws. *Anat. Rec.*, 182, 305-319.
50. Holmbeck,K., Bianco,P., Caterina,J., Yamada,S., Kromer,M., Kuznetsov,S.A., Mankani,M., Robey,P.G., Poole,A.R., Pidoux,I., Ward,J.M., and Birkedal-Hansen,H. (1999). MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell*, 99, 81-92.
51. Hu,P.Y., Roth,D.E., Skaggs,L.A., Venta,P.J., Tashian,R.E., Guibaud,P., and Sly,W.S. (1992). A splice junction mutation in intron 2 of the carbonic anhydrase II gene of osteopetrosis patients from Arabic countries. *Hum. Mutat.*, 1, 288-292.
52. Hughes,A.E., Ralston,S.H., Marken,J., Bell,C., MacPherson,H., Wallace,R.G., van Hul,W., Whyte,M.P., Nakatsuka,K., Hovy,L., and Anderson,D.M. (2000). Mutations in TNFRSF11A, affecting the signal peptide of RANK, cause familial expansile osteolysis. *Nat. Genet.*, 24, 45-48.
53. Hughes,D.E., Dai,A., Tiffée,J.C., Li,H.H., Mundy,G.R., and Boyce,B.F. (1996). Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat. Med.*, 2, 1132-1136.

54. Iotsova,V., Caamano,J., Loy,J., Yang,Y., Lewin,A., and Bravo,R. (1997). Osteopetrosis in mice lacking NF-kappaB1 and NF-kappaB2. *Nat. Med.*, 3, 1285-1289.
55. Ishida,N., Hayashi,K., Hoshijima,M., Ogawa,T., Koga,S., Miyatake,Y., Kumegawa,M., Kimura,T., and Takeya,T. (2002). Large scale gene expression analysis of osteoclastogenesis in vitro and elucidation of NFAT2 as a key regulator. *J Biol. Chem.*, 277, 41147-41156.
56. Jilka,R.L., Hangoc,G., Girasole,G., Passeri,G., Williams,D.C., Abrams,J.S., Boyce,B., Broxmeyer,H., and Manolagas,S.C. (1992). Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science*, 257, 88-91.
57. Jilka,R.L., Weinstein,R.S., Bellido,T., Roberson,P., Parfitt,A.M., and Manolagas,S.C. (1999). Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin. Invest*, 104, 439-446.
58. Joazeiro,C.A., Wing,S.S., Huang,H., Levenson,J.D., Hunter,T., and Liu,Y.C. (1999). The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2- dependent ubiquitin-protein ligase. *Science*, 286, 309-312.
59. Jochum,W., David,J.P., Elliott,C., Wutz,A., Plenk,H., Jr., Matsuo,K., and Wagner,E.F. (2000). Increased bone formation and osteosclerosis in mice overexpressing the transcription factor Fra-1. *Nat. Med.*, 6, 980-984.
60. Johnson,R.S., Spiegelman,B.M., and Papaioannou,V. (1992). Pleiotropic effects of a null mutation in the c-fos proto-oncogene. *Cell*, 71, 577-586.
61. Kaifu,T., Nakahara,J., Inui,M., Mishima,K., Momiyama,T., Kaji,M., Sugahara,A., Koito,H., Ujike-Asai,A., Nakamura,A., Kanazawa,K., Tan-Takeuchi,K., Iwasaki,K., Yokoyama,W.M., Kudo,A., Fujiwara,M., Asou,H., and Takai,T. (2003). Osteopetrosis and thalamic hypomyelination with synaptic degeneration in DAP12-deficient mice. *J. Clin. Invest*, 111, 323-332.
62. Kim,H.J., Rice,D.P., Kettunen,P.J., and Thesleff,I. (1998). FGF-, BMP- and Shh-mediated signalling pathways in the regulation of cranial suture morphogenesis and calvarial bone development. *Development*, 125, 1241-1251.

63. Kim,N., Odgren,P.R., Kim,D.K., Marks,S.C., Jr., and Choi,Y. (2000). Diverse roles of the tumor necrosis factor family member TRANCE in skeletal physiology revealed by TRANCE deficiency and partial rescue by a lymphocyte-expressed TRANCE transgene. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 97, 10905-10910.
64. Komori,T., Yagi,H., Nomura,S., Yamaguchi,A., Sasaki,K., Deguchi,K., Shimizu,Y., Bronson,R.T., Gao,Y.H., Inada,M., Sato,M., Okamoto,R., Kitamura,Y., Yoshiki,S., and Kishimoto,T. (1997). Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, 89, 755-764.
65. Kong,Y.Y., Yoshida,H., Sarosi,I., Tan,H.L., Timms,E., Capparelli,C., Morony,S., Oliveira-dos-Santos,A.J., Van,G., Itie,A., Khoo,W., Wakeham,A., Dunstan,C.R., Lacey,D.L., Mak,T.W., Boyle,W.J., and Penninger,J.M. (1999). OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*, 397, 315-323.
66. Kornak,U., Kasper,D., Bosl,M.R., Kaiser,E., Schweizer,M., Schulz,A., Friedrich,W., Delling,G., and Jentsch,T.J. (2001). Loss of the CIC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell*, 104, 205-215.
67. Kousteni,S., Bellido,T., Plotkin,L.I., O'Brien,C.A., Bodenner,D.L., Han,L., Han,K., DiGregorio,G.B., Katzenellenbogen,J.A., Katzenellenbogen,B.S., Roberson,P.K., Weinstein,R.S., Jilka,R.L., and Manolagas,S.C. (2001). Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell*, 104, 719-730.
68. Kuro-o M, Matsumura,Y., Aizawa,H., Kawaguchi,H., Suga,T., Utsugi,T., Ohyama,Y., Kurabayashi,M., Kaname,T., Kume,E., Iwasaki,H., Iida,A., Shiraki-Iida,T., Nishikawa,S., Nagai,R., and Nabeshima,Y.I. (1997). Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*, 390, 45-51.
69. Lacey,D.L., Timms,E., Tan,H.L., Kelley,M.J., Dunstan,C.R., Burgess,T., Elliott,R., Colombero,A., Elliott,G., Scully,S., Hsu,H., Sullivan,J., Hawkins,N., Davy,E., Capparelli,C., Eli,A., Qian,Y.X., Kaufman,S., Sarosi,I., Shalhoub,V., Senaldi,G., Guo,J., Delaney,J., and Boyle,W.J. (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 93, 165-176.

70. Lagasse,E. and Weissman,I.L. (1997). Enforced expression of Bcl-2 in monocytes rescues macrophages and partially reverses osteopetrosis in op/op mice. *Cell*, 89, 1021-1031.
71. Lane,P. (1971). Grey-lethal. *Mouse News Lett.*, 44, 30.
72. Langford,G.M. (2002). Myosin-v, a versatile motor for short-range vesicle transport. *Traffic.*, 3, 859-865.
73. Lecanda,F., Warlow,P.M., Sheikh,S., Furlan,F., Steinberg,T.H., and Civitelli,R. (2000). Connexin43 deficiency causes delayed ossification, craniofacial abnormalities, and osteoblast dysfunction. *J. Cell Biol*, 151, 931-944.
74. Lerner,U.H. (2000). Osteoclast formation and resorption. *Matrix Biol*, 19, 107-120.
75. Lewis,S.E., Erickson,R.P., Barnett,L.B., Venta,P.J., and Tashian,R.E. (1988). N-ethyl-N-nitrosourea-induced null mutation at the mouse Car-2 locus: an animal model for human carbonic anhydrase II deficiency syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 85, 1962-1966.
76. Li,B., Boast,S., de los,S.K., Schieren,I., Quiroz,M., Teitelbaum,S.L., Tondravi,M.M., and Goff,S.P. (2000a). Mice deficient in Abl are osteoporotic and have defects in osteoblast maturation. *Nat. Genet.*, 24, 304-308.
77. Li,J., Sarosi,I., Yan,X.Q., Morony,S., Capparelli,C., Tan,H.L., McCabe,S., Elliott,R., Scully,S., Van,G., Kaufman,S., Juan,S.C., Sun,Y., Tarpley,J., Martin,L., Christensen,K., McCabe,J., Kostenuik,P., Hsu,H., Fletcher,F., Dunstan,C.R., Lacey,D.L., and Boyle,W.J. (2000b). RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 97, 1566-1571.
78. Li,Y.P., Chen,W., Liang,Y., Li,E., and Stashenko,P. (1999). Atp6i-deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification. *Nat. Genet.*, 23, 447-451.
79. Liu,Y.H., Tang,Z., Kundu,R.K., Wu,L., Luo,W., Zhu,D., Sangiorgi,F., Snead,M.L., and Maxson,R.E. (1999). Msx2 gene dosage influences the number of proliferative osteogenic cells in growth centers of the developing murine skull: a possible mechanism for MSX2-mediated craniosynostosis in humans. *Dev. Biol*, 205, 260-274.

80. Lomaga,M.A., Yeh,W.C., Sarosi,I., Duncan,G.S., Furlonger,C., Ho,A., Morony,S., Capparelli,C., Van,G., Kaufman,S., van der,H.A., Itie,A., Wakeham,A., Khoo,W., Sasaki,T., Cao,Z., Penninger,J.M., Paige,C.J., Lacey,D.L., Dunstan,C.R., Boyle,W.J., Goeddel,D.V., and Mak,T.W. (1999). TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev.*, 13, 1015-1024.
81. Lowe,C., Yoneda,T., Boyce,B.F., Chen,H., Mundy,G.R., and Soriano,P. (1993). Osteopetrosis in Src-deficient mice is due to an autonomous defect of osteoclasts. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90, 4485-4489.
82. Luchin,A., Purdom,G., Murphy,K., Clark,M.Y., Angel,N., Cassady,A.I., Hume,D.A., and Ostrowski,M.C. (2000). The microphthalmia transcription factor regulates expression of the tartrate-resistant acid phosphatase gene during terminal differentiation of osteoclasts. *J. Bone Miner. Res.*, 15, 451-460.
83. Lukert,B.P., *et al.* (1996). Principles of bone biology. *New York: Academic Press*, 533-548.
84. Lyon,M. and Searle,A. (1989). In *Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse*. (Oxford: Oxford University Press), pp 137-138.
85. Manabe,N., Kawaguchi,H., Chikuda,H., Miyaura,C., Inada,M., Nagai,R., Nabeshima,Y., Nakamura,K., Sinclair,A.M., Scheuermann,R.H., and Kuro-o,M. (2001). Connection between B lymphocyte and osteoclast differentiation pathways. *J. Immunol.*, 167, 2625-2631.
86. Manolagas,S.C., Kousteni,S., and Jilka,R.L. (2002). Sex steroids and bone. *Recent Prog. Horm. Res.*, 57, 385-409.
87. Marks,S.C., Jr., Seifert,M.F., and McGuire,J.L. (1984). Congenitally osteopetrotic (op/op) mice are not cured by transplants of spleen or bone marrow cells from normal littermates. *Metab Bone Dis. Relat Res.*, 5, 183-186.
88. Matesic,L.E., Yip,R., Reuss,A.E., Swing,D.A., O'Sullivan,T.N., Fletcher,C.F., Copeland,N.G., and Jenkins,N.A. (2001). Mutations in *Mlph*, encoding a member of the Rab effector family, cause the melanosome transport defects observed in leaden mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98, 10238-10243.

89. McGill,G.G., Horstmann,M., Widlund,H.R., Du,J., Motyckova,G., Nishimura,E.K., Lin,Y.L., Ramaswamy,S., Avery,W., Ding,H.F., Jordan,S.A., Jackson,I.J., Korsmeyer,S.J., Golub,T.R., and Fisher,D.E. (2002). Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell*, 109, 707-718.
90. McHugh,K.P., Hodivala-Dilke,K., Zheng,M.H., Namba,N., Lam,J., Novack,D., Feng,X., Ross,F.P., Hynes,R.O., and Teitelbaum,S.L. (2000). Mice lacking beta3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. *J. Clin. Invest*, 105, 433-440.
91. Mercer,J.A., Seperack,P.K., Strobel,M.C., Copeland,N.G., and Jenkins,N.A. (1991). Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colour locus. *Nature*, 349, 709-713.
92. Miyakoshi,N., Richman,C., Kasukawa,Y., Linkhart,T.A., Baylink,D.J., and Mohan,S. (2001). Evidence that IGF-binding protein-5 functions as a growth factor. *J. Clin. Invest*, 107, 73-81.
93. Miyazaki,T., Katagiri,H., Kanegae,Y., Takayanagi,H., Sawada,Y., Yamamoto,A., Pando,M.P., Asano,T., Verma,I.M., Oda,H., Nakamura,K., and Tanaka,S. (2000). Reciprocal role of ERK and NF-kappaB pathways in survival and activation of osteoclasts. *J Cell Biol.*, 148, 333-342.
94. Montero,A., Okada,Y., Tomita,M., Ito,M., Tsurukami,H., Nakamura,T., Doetschman,T., Coffin,J.D., and Hurley,M.M. (2000). Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation. *J Clin. Invest*, 105, 1085-1093.
95. Motyckova,G., Weilbaecher,K.N., Horstmann,M., Rieman,D.J., Fisher,D.Z., and Fisher,D.E. (2001). Linking osteopetrosis and pycnodysostosis: regulation of cathepsin K expression by the microphthalmia transcription factor family. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 98, 5798-5803.
96. Nakamura,I., Takahashi,N., Udagawa,N., Moriyama,Y., Kurokawa,T., Jimi,E., Sasaki,T., and Suda,T. (1997). Lack of vacuolar proton ATPase association with the cytoskeleton in osteoclasts of osteosclerotic (oc/oc) mice. *FEBS Lett.*, 401, 207-212.

97. Nakashima,K., Zhou,X., Kunkel,G., Zhang,Z., Deng,J.M., Behringer,R.R., and de Crombrughe,B. (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 108, 17-29.
98. Nesbitt,S.A. and Horton,M.A. (1997). Trafficking of matrix collagens through bone-resorbing osteoclasts. *Science*, 276, 266-269.
99. Niida,S., Kaku,M., Amano,H., Yoshida,H., Kataoka,H., Nishikawa,S., Tanne,K., Maeda,N., Nishikawa,S., and Kodama,H. (1999). Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony- stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. *J. Exp. Med.*, 190, 293-298.
100. Ogata,N., Chikazu,D., Kubota,N., Terauchi,Y., Tobe,K., Azuma,Y., Ohta,T., Kadowaki,T., Nakamura,K., and Kawaguchi,H. (2000). Insulin receptor substrate-1 in osteoblast is indispensable for maintaining bone turnover. *J Clin. Invest*, 105, 935-943.
101. Paloneva,J., Kestila,M., Wu,J., Salminen,A., Bohling,T., Ruotsalainen,V., Hakola,P., Bakker,A.B., Phillips,J.H., Pekkarinen,P., Lanier,L.L., Timonen,T., and Peltonen,L. (2000). Loss-of-function mutations in TYROBP (DAPI2) result in a presenile dementia with bone cysts. *Nat. Genet.*, 25, 357-361.
102. Perou,C.M., Moore,K.J., Nagle,D.L., Misumi,D.J., Woolf,E.A., McGrail,S.H., Holmgren,L., Brody,T.H., Dussault,B.J., Jr., Monroe,C.A., Duyk,G.M., Pryor,R.J., Li,L., Justice,M.J., and Kaplan,J. (1996). Identification of the murine beige gene by YAC complementation and positional cloning. *Nat. Genet.*, 13, 303-308.
103. Pittenger,M.F., Mackay,A.M., Beck,S.C., Jaiswal,R.K., Douglas,R., Mosca,J.D., Moorman,M.A., Simonetti,D.W., Craig,S., and Marshak,D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 143-147.
104. Pohlenz,J., Dumitrescu,A., Aumann,U., Koch,G., Melchior,R., Prawitt,D., and Refetoff,S. (2002). Congenital secondary hypothyroidism caused by exon skipping due to a homozygous donor splice site mutation in the TSHbeta-subunit gene. *J Clin. Endocrinol Metab*, 87, 336-339.
105. Provance,D.W., James,T.L., and Mercer,J.A. (2002). Melanophilin, the product of the leaden locus, is required for targeting of myosin-Va to melanosomes. *Traffic.*, 3, 124-132.

106. Rajapurohitam,V., Chalhoub,N., Benachenhou,N., Neff,L., Baron,R., and Vacher,J. (2001). The mouse osteopetrotic grey-lethal mutation induces a defect in osteoclast maturation/function. *Bone*, 28, 513-523.
107. Ravesloot,J.H., Eisen,T., Baron,R., and Boron,W.F. (1995). Role of Na-H exchangers and vacuolar H⁺ pumps in intracellular pH regulation in neonatal rat osteoclasts. *J Gen. Physiol.*, 105, 177-208.
108. Rees,M.I., Lewis,T.M., Kwok,J.B., Mortier,G.R., Govaert,P., Snell,R.G., Schofield,P.R., and Owen,M.J. (2002). Hyperekplexia associated with compound heterozygote mutations in the beta-subunit of the human inhibitory glycine receptor (GLRB). *Hum. Mol. Genet.*, 11, 853-860.
109. Reszka,A.A., Halasy-Nagy,J.M., Masarachia,P.J., and Rodan,G.A. (1999). Bisphosphonates act directly on the osteoclast to induce caspase cleavage of mst1 kinase during apoptosis. A link between inhibition of the mevalonate pathway and regulation of an apoptosis-promoting kinase. *J Biol. Chem.*, 274, 34967-34973.
110. Rodan,G.A. and Martin,T.J. (2000). Therapeutic approaches to bone diseases. *Science*, 289, 1508-1514.
111. Rousselle,A.V. and Heymann,D. (2002). Osteoclastic acidification pathways during bone resorption. *Bone*, 30, 533-540.
112. Sabatakos,G., Sims,N.A., Chen,J., Aoki,K., Kelz,M.B., Amling,M., Bouali,Y., Mukhopadhyay,K., Ford,K., Nestler,E.J., and Baron,R. (2000). Overexpression of DeltaFosB transcription factor(s) increases bone formation and inhibits adipogenesis. *Nat. Med.*, 6, 985-990.
113. Saftig,P., Hunziker,E., Wehmeyer,O., Jones,S., Boyde,A., Rommerskirch,W., Moritz,J.D., Schu,P., and von Figura,K. (1998). Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95, 13453-13458.
114. Salo,J., Lehenkari,P., Mulari,M., Metsikko,K., and Vaananen,H.K. (1997). Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis. *Science*, 276, 270-273.

115. Sanjay,A., Houghton,A., Neff,L., DiDomenico,E., Bardelay,C., Antoine,E., Levy,J., Gailit,J., Bowtell,D., Horne,W.C., and Baron,R. (2001). Cbl associates with Pyk2 and Src to regulate Src kinase activity, alpha(v)beta(3) integrin-mediated signaling, cell adhesion, and osteoclast motility. *J Cell Biol.*, 152, 181-195.
116. Santhanagopal,A., Chidiac,P., Horne,W.C., Baron,R., and Dixon,S.J. (2001). Calcitonin (CT) rapidly increases NA(+)/H(+) exchange and metabolic acid production: effects mediated selectively by the C1A CT receptor isoform. *Endocrinology*, 142, 4401-4413.
117. Sato,M., Morii,E., Takebayashi-Suzuki,K., Yasui,N., Ochi,T., Kitamura,Y., and Nomura,S. (1999). Microphthalmia-associated transcription factor interacts with PU.1 and c-Fos: determination of their subcellular localization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 254, 384-387.
118. Scimeca,J.C., Franchi,A., Trojani,C., Parrinello,H., Grosgeorge,J., Robert,C., Jaillon,O., Poirier,C., Gaudray,P., and Carle,G.F. (2000). The gene encoding the mouse homologue of the human osteoclast-specific 116-kDa V-ATPase subunit bears a deletion in osteosclerotic (oc/oc) mutants. *Bone*, 26, 207-213.
119. Scott,G. (2002). Rac and rho: the story behind melanocyte dendrite formation. *Pigment Cell Res.*, 15, 322-330.
120. Seiberg,M. (2001). Keratinocyte-melanocyte interactions during melanosome transfer. *Pigment Cell Res.*, 14, 236-242.
121. Seifert,M.F. and Marks,S.C., Jr. (1987). Congenitally osteosclerotic (oc/oc) mice are resistant to cure by transplantation of bone marrow or spleen cells from normal littermates. *Tissue Cell*, 19, 29-37.
122. Simonet,W.S., Lacey,D.L., Dunstan,C.R., Kelley,M., Chang,M.S., Luthy,R., Nguyen,H.Q., Wooden,S., Bennett,L., Boone,T., Shimamoto,G., DeRose,M., Elliott,R., Colombero,A., Tan,H.L., Trail,G., Sullivan,J., Davy,E., Bucay,N., Renshaw-Gegg,L., Hughes,T.M., Hill,D., Pattison,W., Campbell,P., Boyle,W.J., and . (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 89, 309-319.
123. Sly,W.S., Hewett-Emmett,D., Whyte,M.P., Yu,Y.S., and Tashian,R.E. (1983). Carbonic anhydrase II deficiency identified as the primary defect in the autosomal recessive syndrome of osteopetrosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 80, 2752-2756.

124. Sobacchi,C., Frattini,A., Orchard,P., Porras,O., Tezcan,I., Andolina,M., Babul-Hirji,R., Baric,I., Canham,N., Chitayat,D., Dupuis-Girod,S., Ellis,I., Etzioni,A., Fasth,A., Fisher,A., Gerritsen,B., Gulino,V., Horwitz,E., Klamroth,V., Lanino,E., Mirolo,M., Musio,A., Matthijs,G., Nonomaya,S., Notarangelo,L.D., Ochs,H.D., Superti,F.A., Valiaho,J., van Hove,J.L., Vihinen,M., Vujic,D., Vezzoni,P., and Villa,A. (2001). The mutational spectrum of human malignant autosomal recessive osteopetrosis. *Hum. Mol. Genet.*, 10, 1767-1773.
125. Soriano,P., Montgomery,C., Geske,R., and Bradley,A. (1991). Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell*, 64, 693-702.
126. Steingrimsson,E., Tessarollo,L., Pathak,B., Hou,L., Arnheiter,H., Copeland,N.G., and Jenkins,N.A. (2002). Mitf and Tfe3, two members of the Mitf-Tfe family of bHLH-Zip transcription factors, have important but functionally redundant roles in osteoclast development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99, 4477-4482.
127. Strewler,G.J. (2001). Local and systemic control of the osteoblast. *J. Clin. Invest.*, 107, 271-272.
128. Suda,T., Takahashi,N., Udagawa,N., Jimi,E., Gillespie,M.T., and Martin,T.J. (1999). Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr. Rev.*, 20, 345-357.
129. Swank,R.T., Novak,E.K., McGarry,M.P., Rusiniak,M.E., and Feng,L. (1998). Mouse models of Hermansky Pudlack syndrome: a review. *Pigment. Cell Res.*, 11, 60-80.
130. Takayanagi,H., Kim,S., Matsuo,K., Suzuki,H., Suzuki,T., Sato,K., Yokochi,T., Oda,H., Nakamura,K., Ida,N., Wagner,E.F., and Taniguchi,T. (2002). RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependant induction of *interferon- β* . *Nature*, 416, 744-749.
131. Takayanagi,H., Kim,S., Koga,T., Nishina,H., Isshiki,M., Yoshida,H., Saiura,A., Isobe,M., Yokochi,T., Inoue,J., Wagner,E.F., Mak,T.W., Kodama,T., and Taniguchi,T. (2002). Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev. Cell*, 3, 889-901.

132. Takeda,S., Elefteriou,F., Levasseur,R., Liu,X., Zhao,L., Parker,K.L., Armstrong,D., Ducy,P., and Karsenty,G. (2002). Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell*, 111, 305-317.
133. Takeshita,S., Namba,N., Zhao,J.J., Jiang,Y., Genant,H.K., Silva,M.J., Brodt,M.D., Helgason,C.D., Kalesnikoff,J., Rauh,M.J., Humphries,R.K., Krystal,G., Teitelbaum,S.L., and Ross,F.P. (2002). SHIP-deficient mice are severely osteoporotic due to increased numbers of hyper-resorptive osteoclasts. *Nat. Med.*, 8, 943-949.
134. Tanaka,S., Nakamura,I., Inoue,J., Oda,H., and Nakamura,K. (2003). Signal transduction pathways regulating osteoclast differentiation and function. *J Bone Miner. Metab*, 21, 123-133.
135. Tassabehji,M., Newton,V.E., and Read,A.P. (1994). Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene. *Nat. Genet.*, 8, 251-255.
136. Teitelbaum,S.L. (2000). Bone resorption by osteoclasts. *Science*, 289, 1504-1508.
137. Teti,A., Blair,H.C., Teitelbaum,S.L., Kahn,A.J., Koziol,C., Konsek,J., Zamboni-Zallone,A., and Schlesinger,P.H. (1989). Cytoplasmic pH regulation and chloride/bicarbonate exchange in avian osteoclasts. *J. Clin. Invest*, 83, 227-233.
138. Thesingh,C.W. and Scherft,J.P. (1985). Fusion disability of embryonic osteoclast precursor cells and macrophages in the microphthalmic osteopetrotic mouse. *Bone*, 6, 43-52.
139. Tondravi,M.M., McKercher,S.R., Anderson,K., Erdmann,J.M., Quiroz,M., Maki,R., and Teitelbaum,S.L. (1997). Osteopetrosis in mice lacking haematopoietic transcription factor PU.1. *Nature*, 386, 81-84.
140. Vaananen,H.K. and Horton,M. (1995). The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure. *J. Cell Sci.*, 108 (Pt 8), 2729-2732.
141. Vacher,J. and Bernard,H. (1999). Genetic localization and transmission of the mouse osteopetrotic grey- lethal mutation. *Mamm. Genome*, 10, 239-243.

142. Walker,D.G. (1975a). Bone resorption restored in osteopetrotic mice by transplants of normal bone marrow and spleen cells. *Science*, 190, 784-785.
143. Walker,D.G. (1975b). Spleen cells transmit osteopetrosis in mice. *Science*, 190, 785-787.
144. Wang,Q., Xie,Y., Du,Q.S., Wu,X.J., Feng,X., Mei,L., McDonald,J.M., and Xiong,W.C. (2003). Regulation of the formation of osteoclastic actin rings by proline-rich tyrosine kinase 2 interacting with gelsolin. *J Cell Biol.*, 160, 565-575.
145. Weilbaecher,K.N., Motyckova,G., Huber,W.E., Takemoto,C.M., Hemesath,T.J., Xu,Y., Hershey,C.L., Dowland,N.R., Wells,A.G., and Fisher,D.E. (2001). Linkage of M-CSF signaling to Mitf, TFE3, and the osteoclast defect in Mitf(mi/mi) mice. *Mol. Cell*, 8, 749-758.
146. Wennberg,C., Hesse,L., Lundberg,P., Mauro,S., Narisawa,S., Lerner,U.H., and Millan,J.L. (2000). Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice. *J Bone Miner. Res.*, 15, 1879-1888.
147. Whyte,M.P. and Hughes,A.E. (2002). Expansile skeletal hyperphosphatasia is caused by a 15-base pair tandem duplication in TNFRSF11A encoding RANK and is allelic to familial expansile osteolysis. *J Bone Miner. Res.*, 17, 26-29.
148. Whyte,M.P., Obrecht,S.E., Finnegan,P.M., Jones,J.L., Podgornik,M.N., McAlister,W.H., and Mumm,S. (2002). Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease. *N. Engl. J Med.*, 347, 175-184.
149. Wilson,S.M., Yip,R., Swing,D.A., O'Sullivan,T.N., Zhang,Y., Novak,E.K., Swank,R.T., Russell,L.B., Copeland,N.G., and Jenkins,N.A. (2000). A mutation in Rab27a causes the vesicle transport defects observed in ashen mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97, 7933-7938.
150. Xu,T., Bianco,P., Fisher,L.W., Longenecker,G., Smith,E., Goldstein,S., Bonadio,J., Boskey,A., Heegaard,A.M., Sommer,B., Satomura,K., Dominguez,P., Zhao,C., Kulkarni,A.B., Robey,P.G., and Young,M.F. (1998). Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice. *Nat. Genet.*, 20, 78-82.

151. Yamaguchi,A., Komori,T., and Suda,T. (2000). Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr. Rev.*, 21, 393-411.
152. Yoshida,H., Hayashi,S., Kunisada,T., Ogawa,M., Nishikawa,S., Okamura,H., Sudo,T., Shultz,L.D., and Nishikawa,S. (1990). The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature*, 345, 442-444.
153. Yoshitake,H., Rittling,S.R., Denhardt,D.T., and Noda,M. (1999). Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 96, 8156-8160.
154. Yousfi,M., Lasmole,F., Lomri,A., Delannoy,P., and Marie,P.J. (2001). Increased bone formation and decreased osteocalcin expression induced by reduced Twist dosage in Saethre-Chotzen syndrome. *J. Clin. Invest*, 107, 1153-1161.
155. Zhang,M., Xuan,S., Bouxsein,M.L., von Stechow,D., Akeno,N., Faugere,M.C., Malluche,H., Zhao,G., Rosen,C.J., Efstratiadis,A., and Clemens,T.L. (2002). Osteoblast-specific knockout of the insulin-like growth factor (IGF) receptor gene reveals an essential role of IGF signaling in bone matrix mineralization. *J. Biol Chem.*, 277, 44005-44012.
156. Zhao,G., Monier-Faugere,M.C., Langub,M.C., Geng,Z., Nakayama,T., Pike,J.W., Chernaused,S.D., Rosen,C.J., Donahue,L.R., Malluche,H.H., Fagin,J.A., and Clemens,T.L. (2000a). Targeted overexpression of insulin-like growth factor I to osteoblasts of transgenic mice: increased trabecular bone volume without increased osteoblast proliferation. *Endocrinology*, 141, 2674-2682.
157. Zhao,W., Byrne,M.H., Wang,Y., and Krane,S.M. (2000b). Osteocyte and osteoblast apoptosis and excessive bone deposition accompany failure of collagenase cleavage of collagen. *J Clin. Invest*, 106, 941-949.
158. Zimmerman,D., Jin,F., Leboy,P., Hardy,S., and Damsky,C. (2000). Impaired bone formation in transgenic mice resulting from altered integrin function in osteoblasts. *Dev. Biol.*, 220, 2-15.

APPENDICE I

	<i>Fyn</i>	<i>D10Mit109</i>	<i>D10Mit193</i>	<i>D10Mit255</i>	<i>D10Mit254</i>	<i>D10Mit184</i>	<i>92.m4.D10-L*</i>	<i>Srx3</i>	<i>Nr2e1</i>	<i>D10Mit108</i>	<i>D9.A5-L*</i>	<i>Sec63</i>	<i>C84.E7-L*</i>	<i>Cd24a</i>	<i>D10Mit54</i>	<i>D10Mit215</i>	<i>D10Mit55</i>	<i>D10Mit148</i>	<i>D10Mit40</i>	<i>D10Mit88</i>	<i>Ros</i>	
Recombinant F3-41 (<i>M.m.molossinus</i>)	MOL/GL	MOL/GL	MOL/GL	?	MOL/GL	MOL/GL	MOL/GL	NP	?	MOL/GL	MOL/GL	NP	GL/GL	NP	GL/GL	GL/GL	GL/GL	GL/GL	GL/GL	GL/GL	GL/GL	?
Agouti-Normale																						
Recombinant 534 (<i>gl/+</i>)	?	GL/GL	GL/GL	GL/GL	GL/GL	GL/GL	+GL	+GL	?	+GL	+GL	NP	+GL	NP	?	?	+GL	+GL	?	?	?	
Agouti-Normale																						
Recombinant F99 (<i>M.m.molossinus</i>)	Ho	GL/GL	GL/GL	GL/GL	GL/GL	GL/GL	GL/GL	GL/GL	?	GL/GL	GL/GL	NP	GL/GL	NP	GL/GL	GL/GL	GL/GL	MOL/GL	MOL/GL	MOL/GL	MOL/GL	
Grise-Ostéopétritique																						

↑ ~ 1000 kb ↑

Tableau 1: Caractérisation des recombinants de souris avec les marqueurs microsatellites et les nouveaux marqueurs générés à partir des extrémités des inserts des clones de YAC (*). Ceci a permis de confirmer l'ordre génétique des marqueurs après modification de la carte génétique (voir texte pour détails) et la délimitation de l'intervalle non-recombinant à une région d'environ 1000 kb (↑). ?, non testé; Ho, homozygote. L'ombrage indique la région exclue.

APPENDICE I

BACs Kb	D10Mfi255	M19-Sp6	D10Mfi254	D10Mfi184	93.m6.C1-L*	E23-T7	I2-Sp6	M19-T7	O19-Sp6	92.m4.D10-L*	I2-T7	Srx3	N2e1	82.m8.H10-L*	E23-SP6	M19-T7	H16-T7	N3-T7	M19-Sp6	H5-T7	D10Mfi108	H16-Sp6	D21-Sp6	N3-Sp6	D9.A5-L*	M6-T7	Sec63	D21-T7	K6-Sp6	H5-Sp6	K6-T7=O4-T7	M6-Sp6	C124			
	MOL/GL	NP	MOL/GL	MOL/GL	NP	NP	?	NP	?	MOL/GL	NP	NP	?	NP	NP	MOL/GL	MOL/GL	MOL/GL	MOL/GL	MOL/GL	MOL/GL	?	?	MOL/GL	MOL/GL	?	NP	NP	NP	MOL/GL	NP	GL/GL	?	NP		
Recombinant F3-41 (<i>M.m.molossinus</i>) Agouti-Normale	GL/GL	NP	GL/GL	GL/GL	NP	NP	?	?	?	GL/GL	NP	+/GL	?	NP	NP	NP	NP	NP	+/GL	NP	+/GL	?	?	+/GL	+/GL	?	NP	NP	NP	+/GL	+/GL	+/GL	?	NP		
Recombinant 534 (gl/+) Agouti-Normale	GL/GL	NP	GL/GL	GL/GL	NP	NP	?	?	?	GL/GL	NP	+/GL	?	NP	NP	NP	NP	NP	+/GL	NP	+/GL	?	?	+/GL	+/GL	?	NP	NP	NP	+/GL	+/GL	+/GL	?	NP		
218M21 100	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
51H14 120	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
545M19 105	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
353O19 180	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
42N8 125	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
205I2 75	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
498E23 130	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
551D16 180	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
135M19 120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
06B18 200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
203H16 150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
373N3 180	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
07D21 120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
343I15 220	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
53N4 20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
369M6 190	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
371K6 100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
501O4 160	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

↑ ~ 500 kb ↓

Tableau 2: Caractérisation des recombinants de souris avec les nouveaux marqueurs générés à partir des extrémités des inserts des clones de YAC (*) et de BAC (T7 ou Sp6). Ceci a permis de délimiter l'intervalle non-recombinant à une région d'environ 500 kb (↑). P, polymorphique; NP, non-polymorphique; ?, non testé. L'ombrage dans les cases correspondant aux génotypes des souris recombinantes (MOL/GL ou GL/GL) indique la région exclue pour *gl*.

APPENDICE II

Tableau 1: Organisation génomique du gène *gl* de souris

Exon No.	Exon Longueur (bp)	Séquences des jonctions exon/intron ^a		Intron No.	Intron Longueur (kb)
		Site donneur	Site accepteur		
1	~ 480	ATCGGG gtgggt	ttgcag AATACC	1	~3.5
2	115	GCGCAA gtgagt	ttacag ATTGCC	2	~9.7
3	98	CTGCAG gtcagt	tttttag GGGCAC	3	~3.2
4	168	GATGCA gtgagt	ttctag ATGAAC	4	~1.7
5	166	TTCTAC gtaagt	ccccag CCAAAC	5	~2.2
6	1973				

a : Exon en lettre majuscule, intron en lettre miniscule.

Tableau 2: Organisation génomique du gène *GL* humain

Exon No.	Exon Longueur (bp)	Séquences des jonctions exon/intron ^a		Intron No.	Intron ^b Longueur (kb)
		Site donneur	Site accepteur		
1	~ 493	GCGGGG gtgggt	ttacag AATACT	1	9.95
2	115	GTGCAA gtaagt	tgacag ATTGTT	2	9.597
3	98	CTTCAG gtatatt	tttttag GGGAAT	3	3.291
4	168	GATGCA gtaagt	ttccag ATGAAC	4	1.612
5	166	TTCTGC gtaagt	atctag CCAAAC	5	4.412
6	2023				

a : Exon en lettre majuscule, intron en lettre miniscule.

b : Séquence génomique obtenue du PAC humain (RP1-111B22) séquencé au centre Sanger (No d'accension: Z98200)

APPENDICE III
Profil d'expression de *gl* au cours du développement

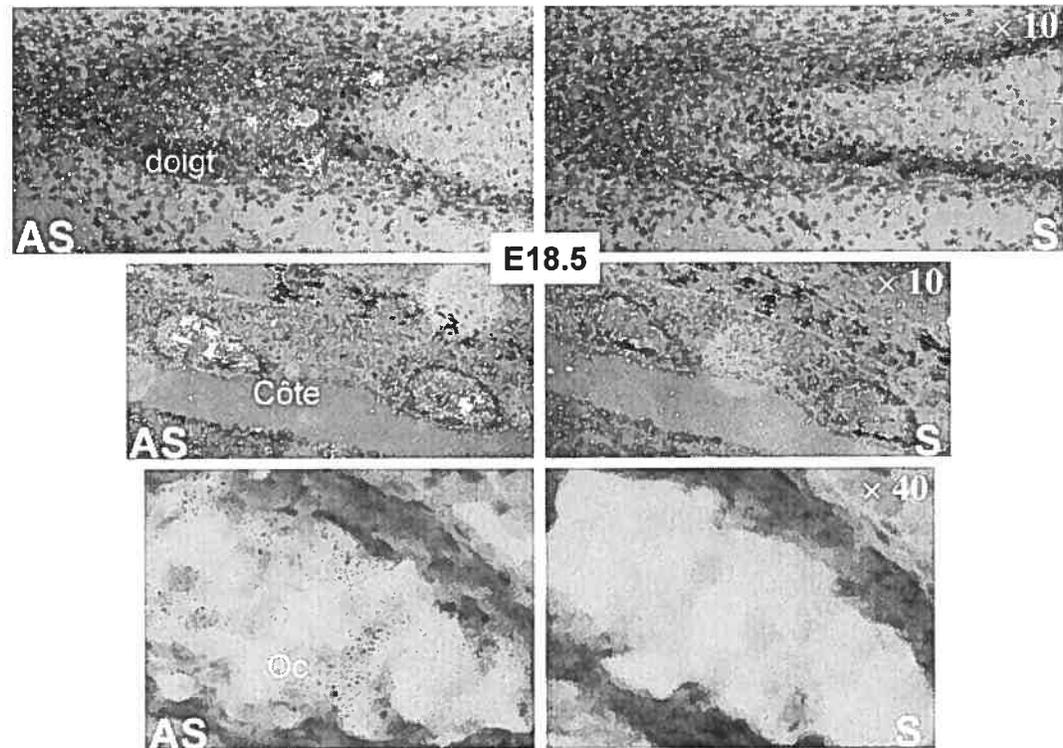


Figure 1: Profil d'expression de *gl* dans le tissu osseux. Oc, ostéoclaste au niveau d'une côte; As, sonde antisens; S, sonde sens.

APPENDICE III
Profil d'expression de *gl* au cours du développement

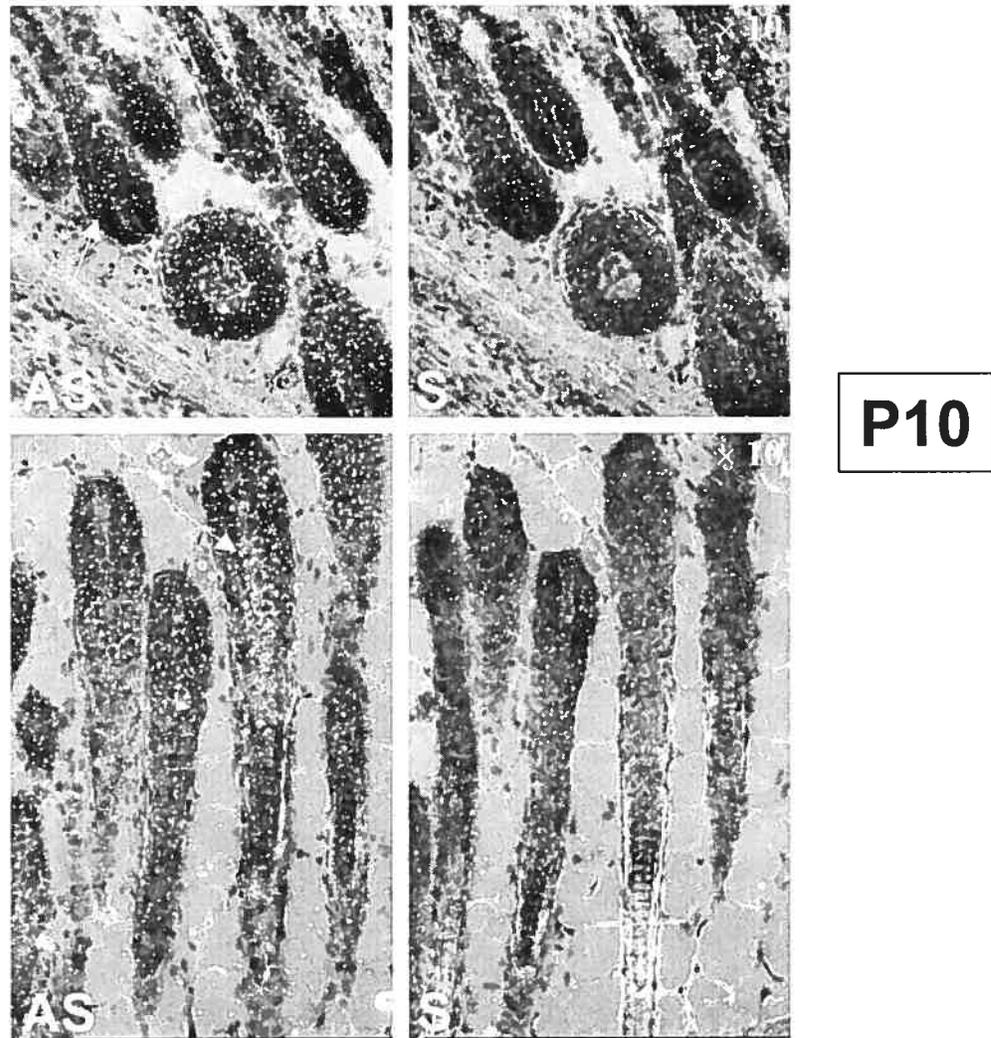


Figure 2: Profil d'expression de *gl* dans la peau. Notons le signal spécifique dans les mélanocytes (flèche) qui est absent des kératinocytes. As, sonde antisens; S, sonde sens.

APPENDICE III
Profil d'expression de *gl* au cours du développement

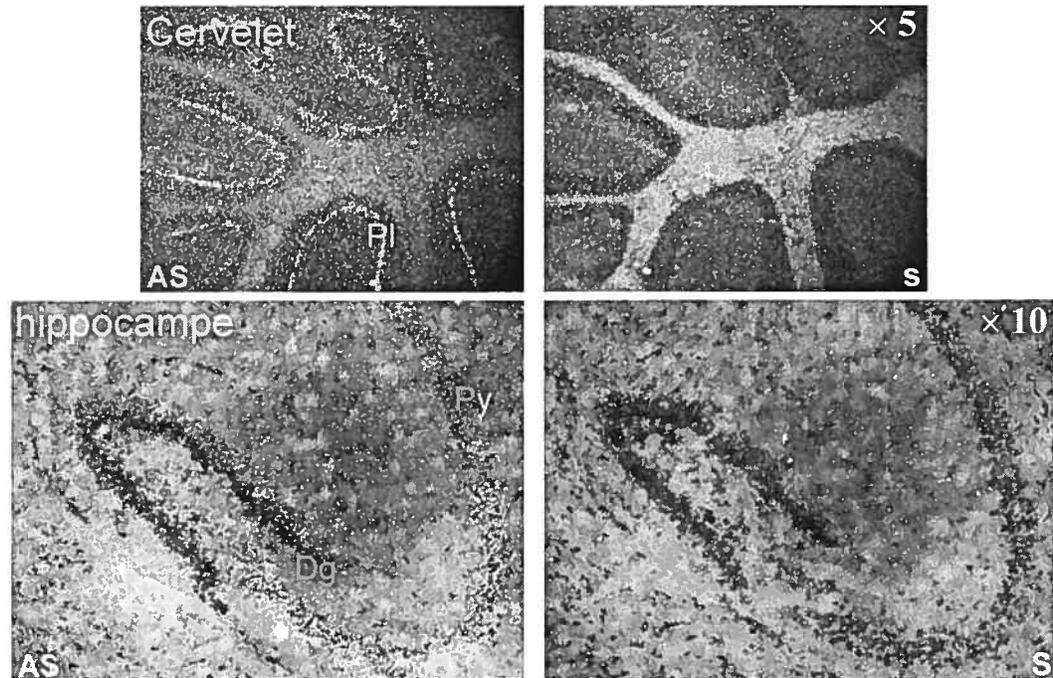


Figure 3: Profil d'expression de *gl* dans le cerveau adulte. Le signal spécifique est présent dans les cellules de Purkinje (Pl) au niveau du cervelet, dans le Dentus gyrus (Dg) et les cellules pyramidales (Py) au niveau de l'hippocampe. As, sonde antisens; S, sonde sens.

APPENDICE III
Profil d'expression de *gl* au cours du développement

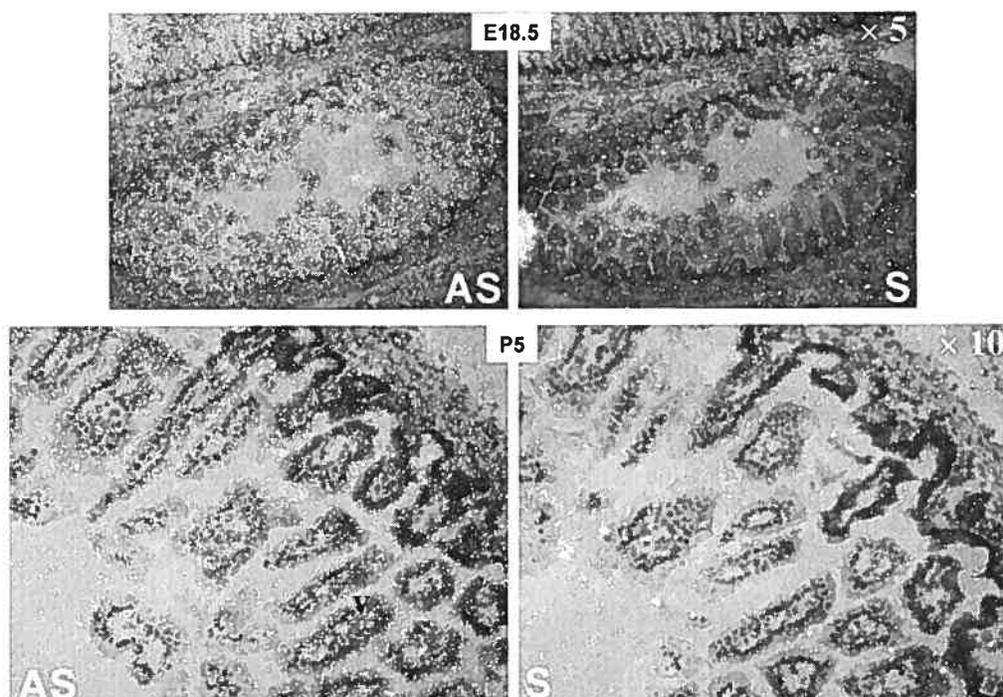


Figure 4: Profil d'expression de *gl* dans l'intestin. Le signal est spécifique aux villosités intestinales (V). As, sonde antisens; S, sonde sens.

Appendice V

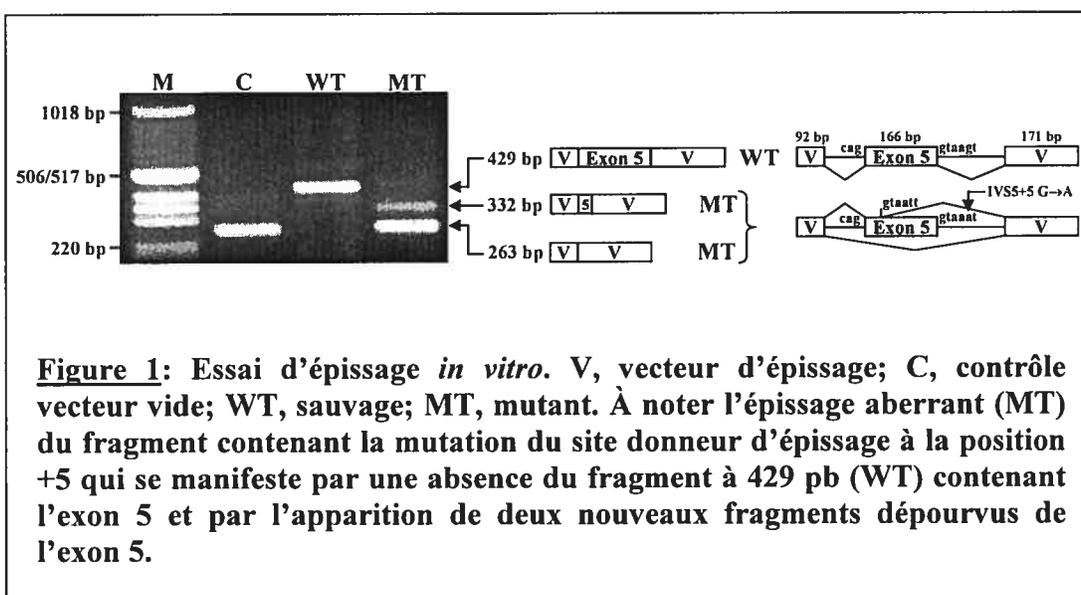
Exon	Séquences d'oligonucléotides (5'→3')	Taille (bp)	T (°C)
1 (Met)	F: ctctcgtgacccggctctc R: cgctgaccatcattacaccctcc	593 ^a	65
2	F: acttagttccttgctggggc R: tcgctatttgctcagttgcc	661 ^b	58
3	F: ccgtgattatgacctgtgcc R: gtgctctaaaaactggaactgc	460 ^b	60
4	F: tgccatctgcttcacataccg R: actgaaggtagcattcaataacactc	721 ^b	55
5	F: cctggcagaagaagttgtctc R: gccactgcacctagccctg	541 ^b	65
6 (Stop + poly-A)	F: tgatgtttttattgtactgcttc R: gctgatggtactcataaaagtaggc	2369 ^b	60

^a 94°C pour 5 min, et 38 cycles à 94°C pour 2 min, 65°C pour 2 min, 72°C pour 3 min, et élongation finale pour 10 min à 72°C.

^b 94°C pour 5 min, et 30 cycles à 94°C pour 1 min, (55-65)°C pour 1 min, 72°C pour 2 min, et élongation finale pour 10 min à 72°C.

Tableau 1: Séquences des oligonucléotides utilisés pour la recherche de mutations dans le gène *GL* humain, et conditions des réactions de PCR. T, température d'appariement.

APPENDICE V



APPENDICE V

