

**Université de Montréal**

***Rôle de l'inositol polyphosphate 4-phosphatase de type II (Inpp4b)  
dans la différenciation et l'activité des ostéoclastes***

**par**

**Mathieu Ferron**

**Programme 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**

**Septembre, 2005**

**©, Mathieu Ferron, 2005**



QH

506

U54

2006

V.006

## **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 :**

***Rôle de l'inositol polyphosphate 4-phosphatase de type II (Inpp4b)***

***dans la différenciation et l'activité des ostéoclastes***

**présenté par :**

**Mathieu Ferron**

**a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :**

**Dr. Jean-Philippe Gratton**

.....  
président-rapporteur

**Dr. Jean Vacher**

.....  
directeur de recherche

**Dr. Jean-François Côté**

.....  
membre du jury

**Dr. Gérard Karsenty**

.....  
examineur externe

**Dr Martine Raymond**

.....  
représentant du doyen de la FES

## RÉSUMÉ

L'ostéopétrose est une maladie génétique causée par l'absence ou la perte d'activité des ostéoclastes, cellules responsables de la résorption du tissu osseux. Chez la souris et l'humain la mutation grey-lethal (*gl*) est associée à un phénotype ostéopétrotique récessif très sévère. *In vivo*, les ostéoclastes *gl* sont présents en plus grand nombre que chez une souris sauvage, par contre ils sont dépourvus de bordure plissée, une structure membranaire essentielle à la résorption. Afin d'identifier d'éventuels gènes cibles de *gl*, nous avons procédé à une étude de "differential display" (DD-PCR), permettant de comparer l'expression génique dans le tissu osseux entre les souris mutante *gl/gl* et sauvage. Cette approche nous a permis d'identifier un nouveau gène, l'inositol polyphosphate 4-phosphatase type II (*Inpp4b*), dont l'expression est réduite dans les ostéoclastes *gl*. L'activité enzymatique d'*Inpp4b* consiste à déphosphoryler le PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>, l'Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> et l'Ins(3,4)P<sub>2</sub> en position 4, produisant du PtdIns(3)P, de l'Ins(1,4)P<sub>2</sub> ou de l'Ins(4)P.

L'objectif des recherches présentées dans cette thèse était de déterminer le rôle d'*Inpp4b* dans la différenciation et l'activité des ostéoclastes. Des études *in vitro*, dans des cellules RAW 264.7, et *in vivo*, dans des souris transgéniques TRAP-*Inpp4b*, ont permis de montrer qu'*Inpp4b* assure deux fonctions dans les ostéoclastes. D'une part, *Inpp4b* serait un régulateur négatif de la voie d'activation du facteur de transcription NFATc1 en aval de RANKL lors de l'ostéoclastogenèse. D'autre part, cette phosphatase serait aussi impliquée dans la dynamique de formation des podosomes, de l'anneau d'actine et de la résorption dans les ostéoclastes matures.

Mes travaux m'ont également amené à mieux caractériser le gène murin *Inpp4b* qui possède une structure et une régulation complexe et qui est exprimé sous plusieurs isoformes (*Inpp4b*α, *Inpp4b*αs et *Inpp4b*β). J'ai notamment pu identifier un nouvel

isoforme d'Inpp4b, Inpp4b $\alpha$ s, et démontrer que l'isoforme Inpp4b $\beta$  était localisé au niveau de l'appareil de Golgi.

Finalement, j'ai pu générer et caractériser des outils qui permettront l'étude *in vivo* de la fonction d'Inpp4b, incluant des allèles nul et conditionnel d'Inpp4b, de même qu'une souris transgénique CD11b-Cre qui exprime la recombinase Cre spécifiquement dans les ostéoclastes et leurs précurseurs. Mes résultats suggèrent un rôle pour Inpp4b dans l'homéostasie osseuse et en font un candidat très intéressant en tant que gène participant à la variabilité de la masse osseuse chez les mammifères, en particulier chez les populations occidentales vieillissantes où l'ostéoporose est une maladie de plus en plus fréquente.

Mots clés : ostéoclaste, ostéopétrose, phosphatidylinositol, phosphatase, Inpp4b, grey-lethal, Cre, lox, knock-out, ablation génique conditionnelle.

## SUMMARY

Osteopetrosis is a rare genetic disease caused by the absence or the lost of activity of osteoclastic cells which are responsible for bone tissue resorption. In mouse and human the grey-lethal (*gl*) mutation is associated with a very severe recessive osteopetrosis. *In vivo*, *gl* osteoclasts are increased in number compared to wildtype mice, but they failed to form ruffled border, a membrane structure implicated in bone resorption. In order to identify putative target genes of *gl*, we have proceeded to a differential display study (DD-PCR), which allows comparative bone tissue gene expression analysis between *gl* mutant and wildtype mice. With this approach we have identified a new gene, inositol polyphosphate 4-phosphatase type II (*Inpp4b*), who is down-regulated in *gl* osteoclasts. Inpp4b dephosphorylates PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>, Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> and Ins(3,4)P<sub>2</sub> at D-4 position, producing PtdIns(3)P, Ins(1,4)P<sub>2</sub> or Ins(4)P.

The objective of the project presented in this thesis was initially to determine the function of Inpp4b in osteoclast differentiation and resorbing activity. *In vitro* studies using RAW 264.7 cells and *in vivo* studies using TRAP-Inpp4b transgenic mice, demonstrate that Inpp4b has two independent cellular functions in osteoclast differentiation and maturation/activation. Inpp4b is a negative regulator of osteoclast differentiation in response to RANKL through the NFATc1 pathway. In the mature osteoclast, Inpp4b phosphatase activity is required for normal podosomes and actin ring formation.

I have also characterized the mouse *Inpp4b* gene, which presents a complex structure and regulation, and which is expressed as multiple isoform (Inpp4b $\alpha$ , Inpp4b $\alpha$ s and Inpp4b $\beta$ ). Notably, I have identified a novel isoform of Inpp4b, Inpp4b $\alpha$ s, and also demonstrated that Inpp4b $\beta$  localized to the Golgi apparatus.

Finally, I have generated genetic tools that will allow functional *in vivo* study of *Inpp4b*, including a null and a conditional allele of *Inpp4b*, and a transgenic CD11b-Cre mice that express Cre recombinase in mature osteoclast and in their precursors. Together my results implicate *Inpp4b* as a modulator of bone homeostasis and suggest that genetic variants in this gene may participate in bone mass variability in mammals, particularly in healthy human population, but also in bone diseases such as osteoporosis.

Keywords: osteoclast, osteopetrosis, phosphatidylinositol, phosphatase, *Inpp4b*, grey-lethal, Cre, lox, conditional knockout.

## RÉSUMÉ DE VULGARISATION

Chez les adultes l'os est un tissu soumis à un constant remodelage qui implique deux activités biologiques : la formation du tissu osseux et son renouvellement suite à sa résorption. Les ostéoblastes sont les cellules responsables de la formation de l'os, alors que la résorption osseuse est effectuée par les ostéoclastes. L'équilibre entre la formation et la résorption de l'os est essentiel au maintien d'une masse osseuse constante dans le temps et est donc finement contrôlé. Il n'en reste pas moins précaire, car le moindre déséquilibre entre la formation et la résorption osseuse conduira à de sérieux troubles incluant l'ostéoporose, l'ostéosclérose et l'ostéopétrose. Alors que l'ostéoporose est causée par une stimulation anormale de l'activité de résorption des ostéoclastes, l'ostéopétrose (du grec *petros* : pierre) est une maladie génétique rare (1/100000) causée par une absence de l'activité de résorption de l'os normalement assurée par les ostéoclastes. Les patients atteints d'ostéopétrose présentent donc une accumulation anormale d'os, pouvant causer l'anémie et une susceptibilité aux infections (immunodéficiences). En plus, des troubles sensoriels comme la surdité et la cécité, et des problèmes respiratoires et neurologiques peuvent survenir. Le seul traitement connu est la greffe de moelle osseuse. Nos recherches s'intéressent aux causes génétiques de l'ostéopétrose chez l'humain. En utilisant un modèle de souris mutante appelée *grey-lethal* nous avons pu montrer que des mutations dans le même gène étaient responsables de l'ostéopétrose chez la souris et chez l'humain.

Au cours de mon doctorat je me suis intéressé à un autre gène, appelé *Inpp4b*, possiblement impliqué dans la biologie des ostéoclastes. Mes travaux m'ont permis de mieux caractériser la fonction de ce gène dans les ostéoclastes en utilisant des modèles cellulaires (*in vitro*) et des modèles de souris transgéniques (*in vivo*). En résumé, mes résultats montrent qu'*Inpp4b* a un effet négatif sur la différenciation des ostéoclastes, le processus par lequel certaines cellules de la moelle osseuse se

transforment en ostéoclastes en présence de signaux spécifiques. Mes résultats montrent qu'Inpp4b est aussi directement impliquée dans l'activité de résorption de l'os par les ostéoclastes.

Les travaux présentés dans cette thèse permettent de supporter l'hypothèse selon laquelle le gène Inpp4b est impliqué dans le contrôle génétique de la masse osseuse chez la souris et l'humain. En effet, chaque individu possède une combinaison unique de gènes et chez certaines personnes cette combinaison sera responsable d'une densité osseuse plus faible qui pourra éventuellement devenir pathologique, comme dans l'ostéoporose. L'identification des gènes responsables de la variation de la masse osseuse, comme Inpp4b, est donc très importante afin de mieux comprendre les maladies osseuses et pour pouvoir éventuellement les guérir.

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS.....	iii
SUMMARY AND KEY WORDS.....	iv
RÉSUMÉ DE VULGARISATION.....	vii
TABLES DES MATIÈRES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xiv
LISTE DES FIGURES.....	xv
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xx
DÉDICACE.....	xxi
REMERCIEMENTS.....	xxii
<b>CHAPITRE 1. INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1.  L'HOMÉOSTASIE OSSEUSE.....	2
1.1.1.  Le tissu osseux.....	2
1.1.2.  Mécanismes contrôlant la différenciation et l'activité des ostéoblastes.....	10
1.1.2.1.  Contrôle transcriptionnel de la différenciation des ostéoblastes.....	11
1.1.2.2.  Contrôle paracrine et autocrine de la différenciation et de l'activité des ostéoblastes.....	13
1.1.2.3.  Contrôle neuroendocrinien de l'activité ostéogénique.....	16
1.2.  MÉCANISMES MOLÉCULAIRES RÉGULANT LA DIFFÉRENCIATION ET L'ACTIVITÉ DES OSTÉOCLASTES.....	18
1.2.1.  Facteurs de différenciation des ostéoclastes.....	20
1.2.1.1.  M-CSF.....	21
1.2.1.2.  RANKL.....	24
1.2.1.3.  TNF $\alpha$ , interféron gamma et beta, récepteurs immunoglobuline-like et autres facteurs.....	24
1.2.1.4.  Fusion.....	31b
1.2.2.  Le système RANKL/RANK/OPG.....	32
1.2.2.1.  Fonction et composants.....	32
1.2.2.2.  Signalisation moléculaire par RANK.....	36

1.2.2.2.1.	Activation du récepteur RANK et les facteurs TRAF.....	37
1.2.2.2.2.	Signalisation en aval de RANK.....	38
1.2.2.2.2.1.	NFkB.....	40
1.2.2.2.2.2.	MAP kinases : ERK, JNK et p38.....	43
1.2.2.2.2.3.	Le calcium, la calcineurine et les facteurs de transcription de la famille NFAT.....	47
1.2.2.2.2.4.	La voie PI3 kinase/AKT.....	49
1.2.3.	Activation de l'ostéoclaste et résorption.....	51
1.2.3.1.	Polarisation, podosomes et anneaux d'actine.....	53
1.2.3.2.	Membrane plissée et résorption.....	56
1.3.	SIGNALISATION PAR LES PHOSPHOINOSITIDES.....	60
1.3.1.	Voie de synthèse générale des différents phosphoinositides et distribution cellulaire des divers phosphatidylinositol phosphates.....	60
1.3.2.	Enzyme de synthèse des phosphoinositides.....	65
1.3.2.1.	Phosphatidylinositol 3-kinases.....	66
1.3.3.2.	Phosphatidylinositol 4-kinases.....	70
1.3.3.3.	Phosphatidylinositol phosphate 5-kinases.....	71
1.3.3.4.	Phosphatidylinositol phosphate 4-kinases.....	73
1.3.3.	Mécanisme d'action des phosphoinositides.....	73
1.3.3.1.	Modules protéiques capables de lier les phosphoinositides.....	74
1.3.3.1.1.	Domaines PH.....	74
1.3.3.1.2.	Domaines PX.....	77
1.3.3.1.3.	Domaines FYVE.....	78
1.3.3.1.4.	Domaines ENTH.....	80
1.3.3.1.5.	Domaines C2.....	80
1.3.3.1.6.	Autres motifs : Tubby, SH2 et DHR-1.....	81
1.3.3.2.	Autres modes d'action.....	82
1.3.4.	Régulation négative par les phosphatidylinositol phosphatases.....	85
1.3.4.1.	3-phosphatases : PTEN, myotubularines et MTMRs.....	85
1.3.4.2.	5-phosphatases : OCRL, SHIP et autres Inpp5.....	88

1.3.4.3.	4-phosphatases : Sac, Inpp4a et Inpp4b.....	91
1.3.5.	Rôles des PI3 kinases, des phosphatidylinositol phosphatases et des phosphoinositides dans le métabolisme osseux.....	98
1.4.	LA SOURIS GREY-LETHAL ET LA PROTÉINE OSTM1.....	102
1.5.	HYPOTHÈSE.....	108

**CHAPITRE 2. L'INOSITOL POLYPHOSPHATE 4-PHOSPHATASE DE TYPE II, UN GÈNE SOUS-EXPRIMÉ CHEZ LA SOURIS OSTÉOPÉTROTIQUE GREY-LETHAL, RÉGULE LA RÉPONSE AU RANKL ET LA RÉSORPTION DANS LES OSTÉOCLASTES.....**

2.1.	MISE EN SITUATION.....	110
2.2.	ARTICLE 1. DUAL FUNCTION OF THE INOSITOL POLYPHOSPHATE 4-PHOSPHATASE TYPE II IN OSTEOCLAST DIFFERENTIATION AND ACTIVATION.....	111

**CHAPITRE 3. CLONAGE ET CARACTÉRISATION DU GÈNE MURIN CODANT POUR L'INOSITOL POLYPHOSPHATE 4-PHOSPHATASE DE TYPE II.....**

3.1.	MISE EN SITUATION.....	156
3.2.	ARTICLE 2. CHARACTERIZATION OF THE MURINE INPP4B GENE AND IDENTIFICATION OF A NOVEL ISOFORM.....	157

**CHAPITRE 4. EXPRESSION SPÉCIFIQUE DE LA RECOMBINASE CRE DANS LES MACROPHAGES ET LES OSTEOCLASTES DANS LES SOURIS TRANSGÉNIQUES CD11B-CRE.....**

4.1.	MISE EN SITUATION.....	191
4.2.	ARTICLE 3. TARGETED EXPRESSION OF CRE RECOMBINASE IN MACROPHAGES AND OSTEOCLASTS IN TRANSGENIC MICE.....	192

<b>CHAPITRE 5. INACTIVATION CONDITIONELLE DU GÈNE INPP4B CHEZ LA SOURIS</b> .....	214
5.1. INTRODUCTION.....	215
5.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	217
5.3. RÉSULTATS.....	220
<b>CHAPITRE 6. DISCUSSION</b> .....	235
6.1. RÔLE D'INPP4B DANS DIFFÉRENCIATION DES OSTÉOCLASTES.....	236
6.2. RÔLE D'INPP4B DANS L'ASSEMBLAGE DES PODOSOMES ET DANS LA RÉSORPTION OSSEUSE.....	240
6.3. LA SOUS-EXPRESSION D'INPP4B CHEZ LA SOURIS GL : UN MÉCANISME COMPENSATOIRE?.....	243
6.4. LOCALISATION ET EXPRESSION DIFFÉRENTIELLE DES ISOFORMES ALPHA ET BETA D'INPP4B.....	247
6.5. LA SOURIS CD11B-CRE : UN OUTIL POUR L'ÉTUDE GÉNÉTIQUE DE L'OSTÉOCLASTOGENÈSE.....	254
6.6. FONCTION D'INPP4B IN VIVO : ABLATION GÉNIQUE CHEZ LA SOURIS.....	256
6.7. INPP4B UN MODULATEUR GÉNÉTIQUE DE L'HOMÉOSTASIE OSSEUSE?.....	260
6.8. CONCLUSION.....	264
<b>RÉFÉRENCES</b> .....	265
<b>ANNEXES</b> .....	307
Annexe 1. Un isoforme de PKC est constitutivement phosphorylé en présence de Inpp4b $\alpha$ (C845A).....	307
Annexe 2. Expression différentielle d'Inpp4b $\alpha$ et $\beta$ dans les tissus de souris sauvage (WT) et homozygote <i>gl/gl</i> ( <i>gl</i> ).....	308
Annexe 3. Expression différentielle d'Inpp4a et d'Inpp4b dans les ostéoblastes et les ostéoclastes.....	309

Annexe 4.	Présence de quatre variants dans la séquence protéique d’Inpp4b entre les souches C3H/HeJ et C57BL/6.....	310
Annexe 5.	Differential display result that lead to Inpp4b identification.....	311
Annexe 6.	Inpp4b protein expression in Trap-Inpp4b transgenic OCL.....	311
Annexe 7.	Liaison aux phospholipides des domaines C2 des isoformes Inpp4ba (C2) et Inpp4bas (C2S).....	312
Annexe 8.	Synthèse et dégradation du PI(3,4,5)P <sub>3</sub> chez les levures (haut) et chez les mammifères.....	313
Annexe 9.	Alignement du domaine C2 d’Inpp4b avec le domaine C2A de la synaptotagmine III [synIII(A)].....	314

## LISTE DES TABLEAUX

Table 2-1. Microcomputed tomography analysis of femur from control (NTg) and transgenic (Tg), heterozygous ( <i>gl/+</i> ) or grey-lethal homozygous ( <i>gl/gl</i> ) mice.....	148
Table 2-2. Nonmetric microarchitectural indices of femur by microcomputed tomography.....	148
Table 3-1. Exon-intron boundaries of the Mouse Inositol Polyphosphate 4-Phosphatase Type II Gene.....	185
Table 3-2. Exon-intron boundaries of the Human Inositol Polyphosphate 4-Phosphatase Type II Gene.....	186
Table 4-1. PCR primer pairs used for transgenic mice screening and in RT-PCR assay.....	210
Table 5-1. Allelic frequency in offspring from <i>Inpp4b</i> <sup>+<i>h</i></sup> heterozygous intercrosses at various C57BL/6 backcross generation (F1 to F5).....	233
Table 5-2. Allelic frequency in offspring from <i>Inpp4b</i> <sup>+<i>Δ</i></sup> heterozygous intercrosses at various C57BL/6 backcross step (F1 to F4).....	233
Table 5-3. Allelic frequency in offspring from <i>Inpp4b</i> <sup>+<i>lox</i></sup> heterozygous intercrosses at various C57BL/6 backcross step (F1 and F2).....	233
Table 5-4. Microcomputed tomography analysis of femur from control (+/+) and <i>Inpp4b</i> -/- ( $\Delta/\Delta$ ) 8 weeks old male and female mice.....	234
Table 5-5. Nonmetric microarchitectural index of femur from control (+/+) and <i>Inpp4b</i> -/- ( $\Delta/\Delta$ ) 8 weeks old male and female mice.....	234
Tableau 6-1. Exemple de gènes impliqués dans l'ostéoclastogenèse dont l'ablation cause des phénotypes de mort embryonnaire ou périnatale chez la souris.....	255
Tableau 6-2. Recensement des QTL osseux associés au locus d' <i>Inpp4b</i> chez les mammifères.....	261

## LISTE DES FIGURES

Toutes les figures reproduites ou adaptées l'ont été avec la permission des éditeurs.

Les sources originales de chaque figure sont indiquées à la fin des légendes.

Figure 1 1.	Représentation schématique d'un os long, ici le fémur.....	3
Figure 1 2.	Photo d'un os normal sous la lumière polarisée.....	5
Figure 1 3.	L'ossification intramembranaire.....	6
Figure 1 4.	L'ossification endochondrale.....	7
Figure 1 5.	La plaque de croissance de l'os est située au niveau de la métaphyse.....	8
Figure 1-6.	Mécanismes impliqués dans la différenciation de l'ostéoblaste.....	10
Figure 1-7.	Ostéoclaste in vivo.....	18
Figure 1-8.	Facteurs impliqués dans la différenciation et l'activation des ostéoclastes.....	21
Figure 1-9.	Coopération entre les signaux induits par RANKL et les protéines à domaine ITAM afin d'induire la différenciation des ostéoclastes...	30
Figure 1-10.	Mécanismes d'action des différents composants de l'axe RANKL/RANK/OPG.....	33
Figure 1-11.	Voies de signalisation activées par RANK dans les ostéoclastes et les réponses cellulaires associées à chacune de ces voies.....	39
Figure 1-12.	Activation de l'ostéoclaste.....	52
Figure 1-13.	Structure des podosomes et de l'anneau d'actine.....	54
Figure 1-14.	Structure chimique d'un dérivé phosphorylé du phosphatidylinositol, le phosphatidylinositol 3-phosphate.....	61
Figure 1-15.	Site de production des divers phosphoinositides et leur implication dans le transport vésiculaire.....	63
Figure 1-16.	Kinases et phosphatases impliquées dans la synthèse et la dégradation des phosphoinositides.....	66
Figure 1-17.	Structure des différentes PI3 kinases.....	67

Figure 1-18.	Représentation de divers modules protéiques capables de lier des phosphoinositides.....	76
Figure 1-19.	Structure de quatre domaines de liaison aux phosphoinositides.....	79
Figure 1-19b	Structure des domaines C2 et liaison au calcium et aux phospholipides.....	80c
Figure 1-20.	Activation de l' $\alpha$ -actinine par sa liaison au PI4,5P <sub>2</sub> .....	83
Figure 1-21.	Inactivation du domaine de liaison à l'actine de la gelsoline par la liaison aux phosphoinositides.....	84
Figure 1-22.	Régulation négative de la voie PI3 kinase/AKT par la phosphatidylinositol 3-phosphatase PTEN.....	86
Figure 1-23.	Augmentation de la densité osseuse chez la souris <i>gl/gl</i> .....	103
Figure 1-24.	Analyse ultrastructurale des ostéoclastes <i>gl/gl</i> .....	104
Figure 1-25.	Immunofluorescence sur des ostéoclastes contrôles et <i>gl/gl</i> placés sur de la dentine.....	104
Figure 1-26.	Séquence (en haut) et modèle (en bas) de la protéine OSTM1.....	106
Figure 2-1.	Inpp4b $\alpha$ expression in wild-type and <i>gl/gl</i> bone cells.....	137
Figure 2-2.	Stable expression of Inpp4b $\alpha$ -EGFP and Inpp4b $\alpha$ (C845A)-EGFP in RAW 264.7 cells.....	138
Figure 2-3.	Effect of Inpp4b $\alpha$ -EGFP and Inpp4b $\alpha$ (C845A)-EGFP overexpression on differentiation potential in response to RANKL.....	139
Figure 2-4.	AKT, ERK, p38 and JNK activation by RANKL in Inpp4b $\alpha$ -EGFP and Inpp4b $\alpha$ (C845A)-EGFP overexpressing RAW cells.....	140
Figure 2-5.	Inpp4b $\alpha$ alters the NFATc1 pathway during osteoclast differentiation.....	141
Figure 2-6.	Inpp4b $\alpha$ localization in osteoclasts.....	143

Figure 2-7.	Inpp4b $\alpha$ phosphatase activity is required for podosomes turnover and bone resorption.....	144
Figure 2-8.	Increased bone density in <i>gl/gl</i> TRAP-Inpp4b $\alpha$ transgenic mice...	145
Figure 2-9.	A schematic model of the novel Inpp4b potential functions in osteoclast differentiation and activation. Dashed arrows indicated uncharacterized molecular mechanism.....	147
Figure 3-1.	Mouse Inpp4b protein sequence.....	176
Figure 3-2.	Inpp4b genetic and physical maps.....	177
Figure 3-3.	Identification of Inpp4b transcription starts sites by 5' primer extension.....	178
Figure 3-4.	mRNA and protein expression patterns of the different Inpp4 isoforms in mouse tissues.....	179
Figure 3-5.	Inpp4b orthologues and paralogues.....	181
Figure 3-6.	Identification and characterization of Inpp4b $\alpha$ s, a new isoform of Inpp4b.....	182
Figure 3-7.	Subcellular localization of Inpp4b $\alpha$ -GFP and Inpp4b $\beta$ -GFP isoforms in COS cells.....	184
Figure 4-1.	.....	204
Figure 4-2.	Quantification of EGFP expression in myeloid cells by FACS analysis.....	205
Figure 4-3.	Quantification of EGFP expression in lymphoid cells by FACS analysis.....	206
Figure 4-4.	Specificity and frequency of recombination in different CD11b-Cre/Z/EG line A double transgenic tissues.....	207
Figure 4-5.	Detection of Cre mediated recombination in microglial cells from CD11b-Cre/Z/EG line A double transgenic, in cerebellum.....	208
Figure 4-6.	Ex-vivo production and characterization of osteoclasts derived from CD11b-Cre/Z/EG line A double transgenic mice.....	209

Figure 5-1.	Recombinaison dans les cellules ES et génération de l'allèle neolox et des souris <i>Inpp4b<sup>n/n</sup></i> .....	226
Figure 5-2.	Recombinaison <i>in vivo</i> dans la souris transgénique CMV-Cre et génération de l'allèle delta11 ( $\Delta I1$ ) et des souris <i>Inpp4b<sup>\Delta\Delta</sup></i> .....	228
Figure 5-3.	Recombinaison <i>in vivo</i> dans la souris <i>FLPeR<sup>+/ki</sup></i> et génération de l'allèle conditionnel <i>lox</i> et des souris <i>Inpp4b<sup>lox/lox</sup></i> .....	230
Figure 5-4.	Analyse de la signalisation moléculaire dans les ostéoclastes <i>Inpp4b<sup>\Delta\Delta</sup></i> .....	231
Figure 6-1.	Rôle potentiel d' <i>Inpp4b</i> dans la dégradation de l'IP3 et la régulation de la relâche de calcium.....	237
Figure 6-2.	Rôle potentiel d' <i>Inpp4b</i> dans le contrôle de l'IP3, du calcium, des PKC et de NFATc1 dans les ostéoclastes.....	238
Figure 6-3.	Rôle potentiel d' <i>Inpp4b</i> dans le contrôle de l'assemblage des podosomes, dans la migration et dans l'activité résorptive des ostéoclastes.....	241
Figure 6-4.	Modèles impliquant le niveau d'expression d' <i>Inpp4b</i> dans le contrôle de l'ostéoclastogenèse chez les souris +/+, <i>gl/gl</i> et <i>gl/gl</i> TRAP- <i>Inpp4b<sup>Tg</sup></i> .....	244
Figure 6-5.	Modèle de la localisation cellulaire des divers isoformes des inositol polyphosphate 4-phosphatases $\alpha$ et $\beta$ .....	247
Figure 6-6.	Alignement de la région C-terminale des isoformes $\alpha$ et $\beta$ d' <i>Inpp4a</i> (Type I) et d' <i>Inpp4b</i> (Type II).....	251

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

bp : base pair

cDNA : complementary DNA

Chr : chromosome

°C : degree celsius/degré celsius

C2 : protein kinase C homology region 2

DNA : deoxyribonucleic acid

dNTP : deoxyribonucleoside triphosphate

E : embryonic day

EST: expressed sequence tag

*gl* : grey-lethal

h : hour/heure

Inpp4a et INPP4A : inositol polyphosphate 4-phosphatase de type I

Inpp4b et INPP4B : inositol polyphosphate 4-phosphatase de type II

Ins : inositol

IP3 ou InsP3 : inositol 1,4,5-triphosphate

kb : kilobase

kD ou kDa : kilodalton

min : minute

microCT ou  $\mu$ CT : micro-computed tomography

ml : millilitre/milliliter

$\mu$ l : microlitre/microliter

mM : millimolaire/millimolar

$\mu$ M : micromolaire/micromolar

mm : millimètre/millimeter

$\mu$ m : micromètre/micromiter

mRNA : messenger RNA

pb : paire de base

ADNc : ADN complémentaire

ADN : acide déoxyribonucléique

ARNm : ARN messenger

NFAT ou NF-AT : nuclear factor of activated T-cell

ng : nanogramme/nanogram

OCL : osteoclast like cell

PCR : polymerase chain reaction

pg : picogramme/picogram

PI ou PtdIns : phosphatidylinositol

PI3K ou PI3 kinase : phosphatidylinositol 3-kinase

PIP2 : phosphatidylinositol 4,5-biphosphate

PIP3 : phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate

P : postnatal day

PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis

PEST : proline/aspartic and glutamic acid/serine/threonine rich sequence

QTL : quantitative trait loci ou locus

RNA : ribonucleic acid

ARN : acide ribonucléique

RT-PCR : reverse transcriptase-PCR

SDS : sodium dodecylsulfate

U : unit

UTR : untranslated region

*À la raison, pure, solide, triomphante de toutes les passions  
et qui un jour j'espère saura guider les hommes...*

## REMERCIEMENT

Mes remerciements vont d'abord au Dr Jean Vacher pour m'avoir accueilli dans son laboratoire afin de poursuivre mes travaux de doctorat. Je me souviendrai particulièrement de son ouverture d'esprit, de sa grande disponibilité et de la confiance et de la liberté qu'il accorde à ses étudiants.

J'aimerais aussi remercier les membres du jury, Dr Jean-Philippe Gratton, Dr Jean-François Côté et Dr Gerard Karsenty qui ont voulu prendre le temps de lire cette thèse. Je remercie également les différents chercheurs ayant participé à mes comités de suivi : Dr Marie Trudel, Dr Sylvain Meloche, Dr Benoît Coulombe, Dr Michel Tremblay et Dre Martine Raymond.

Je remercie les organismes suivant pour le financement et les bourses qui m'ont permis de poursuivre mes études : le Fond de recherches en santé du Québec, les Instituts canadiens de recherches en santé, l'Institut de recherches cliniques de Montréal et la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal.

Je remercie également toutes les personnes que j'ai côtoyées et grandement appréciées aux cours des dernières années dans le laboratoire du Dr Vacher et qui ont su prendre mes bons et mauvais côtés : Jannie Beauregard, Céline Héraud, Nader Chalhoub, Michel Arsenault, Camille Lobry, Michelle D'Attoni, Geneviève Despars et Venkatesh Rajapurohitam. J'ai une pensée particulière pour Monica Pata une étudiante et une technicienne exceptionnelle, et ma voisine de paillasse pendant les quatre dernières années. Elle a contribué aux travaux présentés dans cette thèse, mais elle aussi fait passer le temps plus vite, du côté gauche du labo.

Merci à tous ces amis que je me suis faits durant mes études à l'IRCM et qui m'ont aidé, chacun à sa façon, à terminer cette thèse et les travaux qu'elle contient : Luc « Furax » Furic, pour ces soirées à, tout simplement, parler de science; Romain

« Romaine » Roncagalli pour ses conseils et son amitié; Benjamin « Benjani » Turgeon pour du matériel, des conseils et les billards du vendredi; François « Frank » Duhamel pour jouer de la guitare et pour chialer; Philippe Coulombe et Stéphane Pelletier pour les cigarettes fumées entre deux manips; Dr Benoît Grondin pour avoir un ami et se taper la cuisse; Jean-Hugues Fournier, Alexandre « Dr Moron » Benoît, Julie Robichaud, Nadia Rabah, Bastien Llamas, Martin Couillard et tous les autres.

Je voudrais aussi remercier mes parents, Marcel Ferron et Thérèse Melançon, qui m'ont toujours supporté moralement et financièrement dans les choix que j'ai fait. C'est une chance qui n'est pas donné à tous.

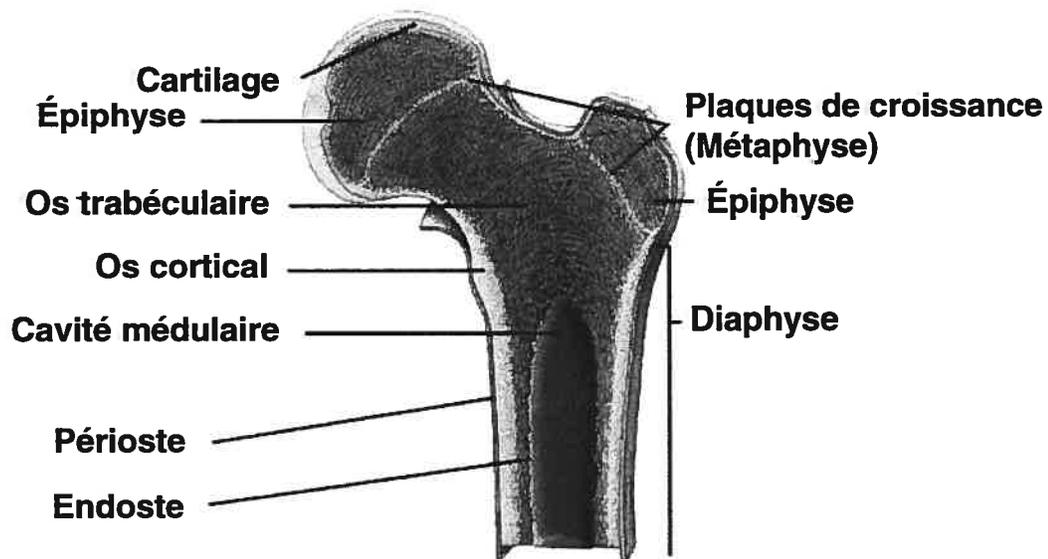
## **CHAPITRE 1. INTRODUCTION**

## **1.1. L'HOMÉOSTASIE OSSEUSE**

L'os est un constituant essentiel des vertébrés, incluant les humains. Malgré tout, ce tissu est souvent considéré par le commun des mortels comme inerte, statique et mort, alors qu'en fait, c'est tout le contraire. Pour reprendre le titre d'un récent article, « l'os, c'est plus qu'un bâton » (Loveridge, 1999). En fait, tous les os de notre corps sont soumis à un constant remodelage qui résulte de l'action opposée, mais concertée, de deux types de cellules : les ostéoblastes et les ostéoclastes. L'ostéoblaste est la cellule responsable de la formation et du dépôt de la matrice osseuse, alors que l'ostéoclaste assure la fonction inverse, c'est-à-dire qu'il résorbe l'os. L'équilibre entre la formation et la résorption de l'os est essentiel au maintien d'une masse osseuse constante dans le temps et est donc finement contrôlé. Il n'en reste pas moins précaire, car le moindre déséquilibre entre formation et résorption osseuse conduira à de sérieux troubles incluant l'ostéoporose, l'ostéosclérose, l'ostéopétrose et les syndromes ostéolytiques. Pour le moment, on peut affirmer qu'il existe peu de traitements efficaces et surtout curatifs pour ces maladies. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires qui contrôlent l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes reste donc un objectif important dans le domaine de la biologie osseuse.

### **1.1.1. Le tissu osseux**

L'endosquelette formé d'os minéralisé est une caractéristique propre aux vertébrés. L'os comme tel est un tissu conjonctif spécialisé qui forme, avec le cartilage, le système squelettique. Cette charpente, rigide et souple à la fois, remplit trois fonctions importantes : 1) une fonction mécanique en étant à la fois un support et le site d'attachement des muscles requis pour la locomotion; 2) une fonction protectrice pour les organes vitaux et la moelle osseuse; 3) une fonction métabolique dans le maintien de l'homéostasie du sérum, en tant que réserve d'ions, plus particulièrement calcium et phosphate.



**Figure 1-1.** Représentation schématique d'un os long, ici le fémur.

La structure anatomique des os longs adultes comporte plusieurs éléments qui dérivent en fait de son développement et de sa croissance, processus qui seront décrit plus loin dans cette section. On distingue d'abord les extrémités plus larges de l'os que l'on appelle épiphyses, de la partie centrale longue et cylindrique que l'on appelle diaphyse (Figure 1.1). Une zone associée à la croissance, la métaphyse, se retrouve finalement entre l'épiphyse et la diaphyse. Dans un os en croissance, l'épiphyse et la métaphyse, qui dérivent de deux centres d'ossification différents, sont séparées par une couche de cartilage, aussi appelée plaque de croissance. Responsable de la croissance longitudinale de l'os, cette couche cartilagineuse proliférative se calcifie complètement à la fin de la croissance. La partie externe de l'os est formée par une couche dense et épaisse de tissu calcifié, l'os cortical, qui contient la cavité médullaire où se trouve la moelle osseuse essentielle à l'hématopoïèse chez l'adulte. La surface extérieure de l'os, en contact avec les muscles et les cartilages, est le périoste, alors que la surface interne, en contact avec la moelle, est l'endoste. Près de la métaphyse et de l'épiphyse l'os cortical est plus mince et l'espace interne est

rempli d'un réseau de minces trabécules calcifiés. Ce type d'os est appelé os trabéculaire. L'os cortical et l'os trabéculaire sont composés des mêmes cellules et de la même matrice extracellulaire, cependant, leurs fonctions respectives diffèrent. Le cortex étant majoritairement composé d'os compact (80-90%), il joue un rôle mécanique et protecteur. L'os trabéculaire étant peu calcifié (15-25%) et présentant une plus grande surface d'interaction avec le milieu non osseux (moelle, vaisseaux sanguins, ostéoblastes et ostéoclastes), il joue donc un rôle plutôt métabolique. Considérant cet état de fait, on notera également que l'os trabéculaire est plus susceptible d'être affecté par un déséquilibre de l'homéostasie osseuse. Ainsi, les parties du squelette comportant le plus grand pourcentage d'os trabéculaire, sont aussi celles qui sont les plus affectées (plus grand risque de fracture) dans des pathologies comme l'ostéoporose et les tumeurs ostéolytiques : la tête fémorale (50-75% d'os trabéculaire), le poignet (25% d'os trabéculaire) et les vertèbres lombaires (60-75% d'os trabéculaire). En comparaison, la diaphyse du fémur, formée en presque totalité d'os cortical, comporte moins de 5% d'os trabéculaire.

Comme tout les tissus conjonctifs l'os est formé de deux constituants principaux, soit des cellules et de la matrice extracellulaire. Dans les os, le cartilage et les dents, cette matrice se distingue cependant de celle contenue dans les autres tissus conjonctifs par la propriété unique qu'elle a de pouvoir être calcifiée. Cette matrice extracellulaire, particulièrement abondante dans ce tissu, est composée de fibre de collagène de type I (90% des protéines totale), de protéoglycans et de glycoprotéines (fibronectine, ostéopontine, ostéonectine, ostéocalcine, vitronectine, sialoprotéine osseuse). La plupart de ces protéines sont synthétisées et déposées par les ostéoblastes. À cette composition protéique, s'ajoute des cristaux d'hydroxyapatite  $[3Ca_3(PO_4)_2] \cdot (OH)_2$  que l'on retrouve dans et sur les fibres de collagène et qui forment la partie minérale de l'os. L'orientation préférentielle des fibres de collagène alterne de couche en couche dans l'os adulte, donnant à cet os une structure typiquement lamellaire que l'on peut observer en microscopie électronique ou sous une lumière polarisée (Figure

1.2). Cette organisation est celle qui permet la plus grande densité de collagène par unité de volume, ce qui explique, en partie, la grande rigidité du tissu osseux.



**Figure 1-2. Photo d'un os normal sous la lumière polarisée.**

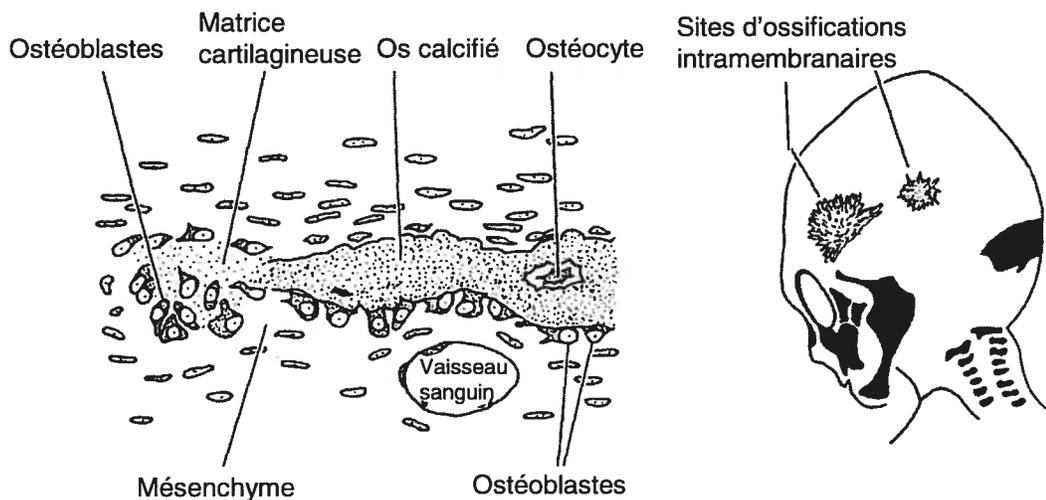
Le tissu osseux est organisé en structures lamellaires (Reproduit avec la permission de la Paget Fondation).

Les types cellulaires retrouvés dans l'os comme tel (ce qui exclut la moelle osseuse) sont l'ostéocyte, l'ostéoblaste et l'ostéoclaste. Des sections subséquentes de ce chapitre traiteront de l'origine, de la différenciation et de l'activité respective de l'ostéoblaste et de l'ostéoclaste en tant que cellules responsables du maintien de l'homéostasie osseuse.

Les ostéocytes dérivent d'ostéoblastes qui sont restés emprisonnés suite au processus d'ossification. Ces cellules sont donc encastrées dans l'os dans de petites cavités ostéocytiques (environ  $25000/\text{mm}^3$  d'os) et cessent par la suite de se diviser. Les ostéocytes présentent de nombreuses et très longues projections riches en microfilaments qui traversent la matrice osseuse et entrent en contact avec les projections d'autres ostéocytes, mais également avec les ostéoblastes retrouvés à la

surface de la matrice. Ces projections sont organisées avant la calcification de la matrice et forme donc un réseau de canicules à travers tout l'os. Le rôle des ostéocytes dans la biologie de l'os est encore mal connu. Les données récentes suggèrent cependant que ces cellules auraient une fonction mécanosensorielle dans la détermination de la structure des os (Klein-Nulend et al., 2003). Le destin ultime de l'ostéocyte est d'être phagocyté, puis digéré avec le reste de la matrice osseuse, par les ostéoclastes lors d'une phase de résorption osseuse.

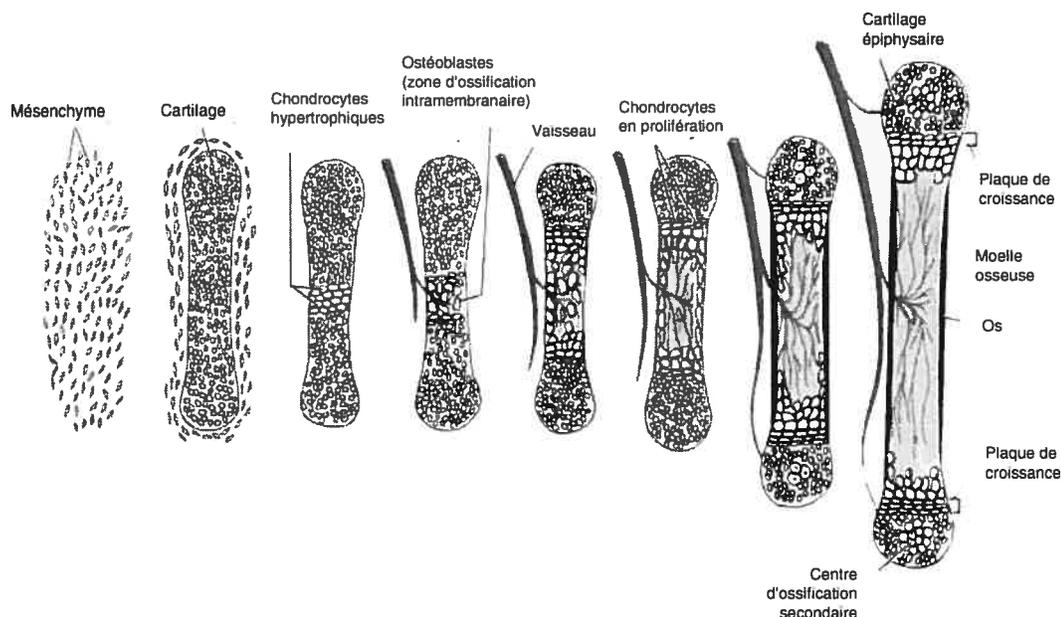
Au niveau anatomique on classe les os dans l'une ou l'autre de deux catégories : les os plats (os crâniens, omoplate, mâchoire inférieure) et les os longs (fémur, tibia, humérus, etc.). Ces deux types d'os sont le résultat de deux mécanismes développementaux distincts : l'ossification intramembranaire et l'ossification endochondrale, respectivement. Cependant, comme on le verra plus loin, le développement des os longs requiert les deux types d'ossification. La principale différence entre ces deux types d'ossification est la présence d'une phase cartilagineuse dans l'ossification endochondrale.



**Figure 1-3. L'ossification intramembranaire.**

Ce type d'ossification est impliqué dans la formation des os plats comme ceux du crâne (Gilbert, 2000).

Dans l'ossification intramembranaire, un groupe de cellules mésenchymateuses prolifèrent et se différencient directement en préostéoblastes, puis en ostéoblastes (Figure 1-3). Ces cellules synthétisent ensuite une matrice dans laquelle les fibres de collagène ne sont pas orientées de façon précise. L'os qui en résulte est ainsi appelé os tissé, par opposition à l'os adulte qui est lamellaire. La calcification dans ce type d'os est relativement lente et irrégulière, et les ostéocytes qui y sont retrouvés sont gros et très nombreux. Des cycles subséquents de remodelage par les ostéoclastes et les ostéoblastes permettront de remplacer la matrice désorganisée initiale par de l'os lamellaire.

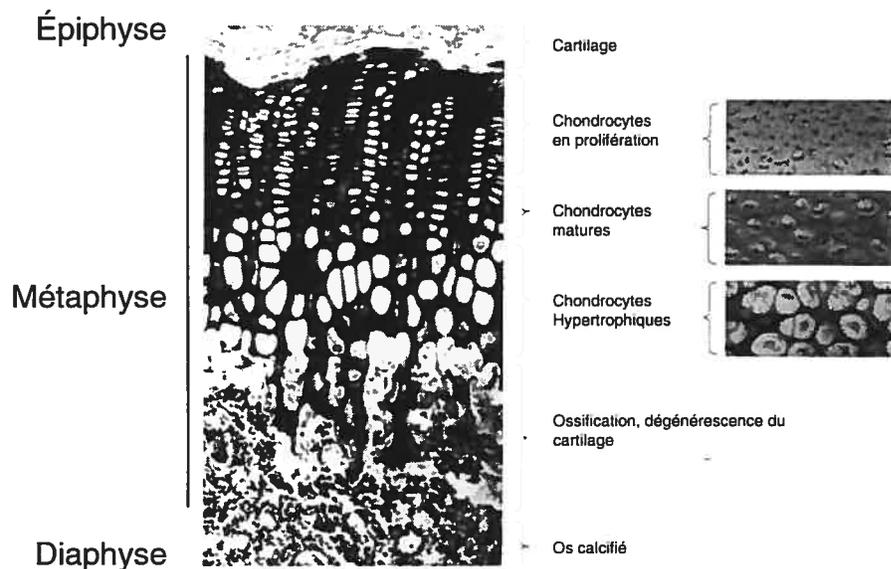


**Figure 1-4. L'ossification endochondrale.**

Ce type d'ossification est impliqué dans le développement des os longs (Gilbert, 2000).

Dans l'ossification endochondrale les cellules mésenchymateuses prolifèrent et se différencient en préchondroblastes, puis en chondroblastes (Figure 1-4). Ces cellules sont responsables de la formation de la matrice cartilagineuse. Comme les ostéoblastes, les chondroblastes restent emprisonnés dans leur propre matrice extracellulaire, devenant ainsi des chondrocytes. Comme le cartilage est plutôt

gélatineux, les chondrocytes continuent à se diviser, formant, au niveau de la plaque de croissance des colonnes régulières de cellules qui deviennent graduellement hypertrophiques avant de mourir par apoptose. Cette première étape de formation laisse une charpente de cartilage non vascularisé qui servira à construire l'os calcifié. Tôt lors du développement de cet os, un anneau d'os tissé est formé par ossification intramembranaire au milieu de l'os sous ce qui deviendra le périoste. Suite à la calcification de cet os tissé, des ostéoclastes l'envahissent, permettant la vascularisation du cartilage et l'apport de cellules hématopoïétiques qui formeront ensuite la moelle osseuse (Karsenty and Wagner, 2002).



**Figure 1-5. La plaque de croissance de l'os est située au niveau de la métaphyse.**

Les chondrocytes prolifèrent dans une région près de l'épiphyse, alors que l'ossification comme telle se produit dans une région plus près de la métaphyse (Gilbert, 2000).

La plaque de croissance d'un os long en développement présente plusieurs événements cellulaires (Figure 1.5). D'abord, près de la diaphyse dans une zone de prolifération, les chondroblastes se divisent et synthétisent activement la matrice. Ces cellules grossissent progressivement, augmentant la lacune qu'elles occupent dans la zone hypertrophique. Elles meurent ensuite par apoptose. A ce niveau de la plaque de l'épiphyse, la matrice du cartilage se calcifie. Une fois calcifiée la matrice

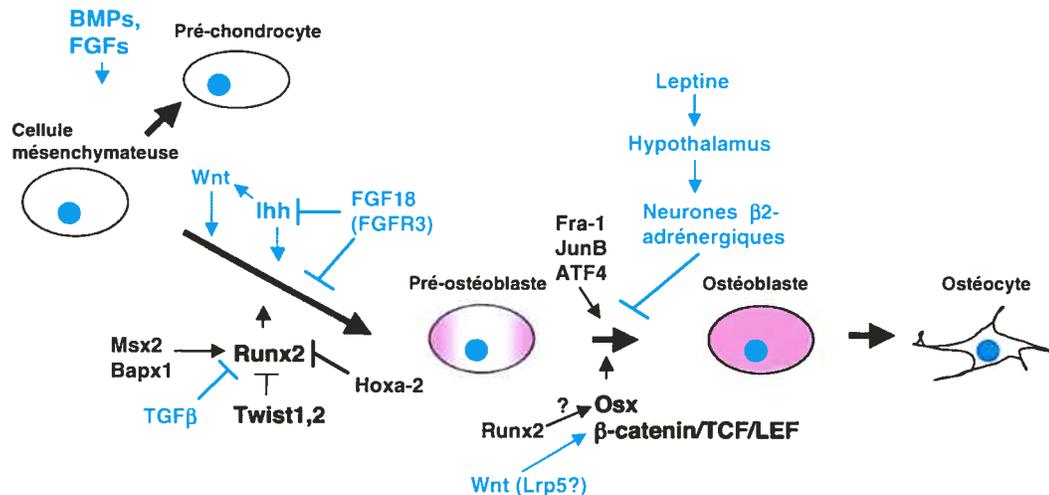
cartilagineuse est résorbée partiellement par les ostéoclastes, et des vaisseaux sanguins apparaissent dans cette zone. Suite à la résorption, des ostéoblastes se différencient et déposent une première couche d'os tissé. On nomme spongiosité primaire le trabécule qui résulte de cette première ronde de remodelage. Plus bas dans la plaque de croissance, l'os tissé est soumis à une deuxième ronde de remodelage au cours de laquelle il est remplacé, lui et le cartilage restant, par de l'os lamellaire. Cette deuxième étape conduit à la formation de spongiosité secondaire, l'état mature des trabécules.

A la fin de la croissance, les rondes de remodelage local de l'os se poursuivent. Ce mécanisme a pour but principal le renouvellement constant de la matrice osseuse. Ainsi, dans l'os adulte, la formation de l'os ne peut se produire qu'après une étape de résorption. Il est donc admis que les deux processus sont très intimement liés. Comme on le verra plus loin dans cette thèse, des mécanismes moléculaires précis permettent aux deux cellules impliquées dans le remodelage osseux, l'ostéoblaste et l'ostéoclaste, de contrôler réciproquement leur différenciation et leur activité.

Le processus de remodelage commence par le recrutement, à un microsite précis, de précurseurs ostéoclastiques. Ces précurseurs migrent au site de remodelage à partir des vaisseaux sanguins. Une fois attachés à la matrice osseuse, les préostéoclastes, se différencient en ostéoclastes matures multinucléés et commencent à résorber. Les ostéoclastes meurent ensuite par apoptose et sont remplacés par des ostéoblastes. Ces derniers vont déposer une nouvelle matrice dans la lacune creusée par les ostéoclastes. Une fois la phase de formation terminée, l'ostéoblaste cesse de produire de la matrice, meurt par apoptose et/ou devient un ostéocyte.

La vaste majorité des maladies osseuses résultent d'un excès ou d'une trop faible activité lors de l'une des phases du remodelage osseux. Ainsi un excès de résorption conduira à l'ostéoporose ou à l'ostéopénie, tandis qu'un excès de formation (ou une perte de résorption) provoquera l'ostéopétrose ou l'ostéosclérose. Nous aborderons

dans les sections qui suivent les mécanismes généraux qui régulent la différenciation et l'activité des deux cellules impliqués dans le remodelage osseux, l'ostéoblaste et l'ostéoclaste.



**Figure 1-6. Mécanismes impliqués dans la différenciation de l'ostéoblaste.**

Les facteurs de croissance neuroendocriniens, paracrines et autocrines ayant une action positive et négative sont représentés en bleu. Les facteurs de transcription impliqués dans l'expression des gènes spécifiques aux ostéoblastes sont représentés en noir.

### 1.1.2. Mécanismes contrôlant la différenciation et l'activité des ostéoblastes

L'ostéoblaste est une cellule d'origine mésenchymateuse qui dérive d'un précurseur commun aux chondrocytes (Ducy et al., 1997) (Figure 1-6). L'ostéoblaste assure trois fonctions dans l'os. Il est d'abord responsable de la formation de l'os, c'est à dire de la synthèse et de la sécrétion des protéines de la matrice extracellulaire osseuse. L'ostéoblaste exprime également les gènes nécessaires et suffisants à la minéralisation de cette matrice. La troisième fonction de l'ostéoblaste est d'assurer la différenciation des ostéoclastes et, par le fait même, de contrôler la résorption osseuse (Karsenty and Wagner, 2002). Ce contrôle, s'effectue principalement par la production de deux facteurs qui stimule la différenciation et l'activité de l'ostéoclaste, RANKL et M-CSF, et par la sécrétion d'un inhibiteur de l'ostéoclastogenèse, l'ostéoprotégérine (OPG). Le système RANK/RANKL/OPG sera abordé

ultérieurement. Je décrirai d'abord quelques-uns des mécanismes les plus importants qui contrôlent la différenciation et l'activité des ostéoblastes.

#### **1.1.2.1. Contrôle transcriptionnel de la différenciation des ostéoblastes**

La différenciation de l'ostéoblaste est contrôlée par le facteur de transcription Runx2/Cbfa1, une protéine à domaine runt, homologue au facteur Runt de la drosophile (Ducy et al., 1996) (Figure 1-6). L'ablation de ce gène chez la souris (Runx2<sup>-/-</sup>) résulte en une absence d'ostéoblaste et de matrice osseuse minéralisée chez le nouveau né, démontrant le rôle essentiel de cette protéine dans la différenciation de l'ostéoblaste et dans la formation de la matrice osseuse (Komori et al., 1997; Otto et al., 1997). Les ostéoclastes sont également absents chez la souris Runx2<sup>-/-</sup>, démontrant le rôle essentiel que jouent les ostéoblastes dans la différenciation des ostéoclastes. Des mutations dans le locus humain de Runx2 sont responsables de la dysplasie cleidocranienne, une maladie autosomale dominante caractérisée par l'absence de clavicules, des fontanelles ouvertes et une courte stature (Mundlos et al., 1997). Runx2 active directement la transcription de gènes impliqués dans l'activité et la différenciation des ostéoblastes comme l'ostéocalcine (OCN), le collagène de type I, l'ostéopontin (OPN) et la collagénase 3 (Ducy et al., 1997; Selvamurugan et al., 1998; Kern et al., 2001). L'expression de Runx2 durant le développement précède la différenciation des ostéoblastes et l'expression de l'ostéocalcine (Ducy et al., 1997). Finalement, l'expression ectopique de Runx2 *in vivo* peut provoquer l'ossification endochondrale de certains tissus normalement non ossifiées (Takeda et al., 2001; Ueta et al., 2001). L'ensemble de ces évidences démontre que Runx2 est nécessaire et suffisant pour la différenciation des ostéoblastes chez l'humain et chez la souris.

Plusieurs évidences suggèrent que la transcription de Runx2 dans les ostéoblastes serait contrôlée en aval par trois facteurs à homéodomaine, Msx2, Bapx1 et Hoxa-2 (Figure 1-6). Msx2 est exprimé dans les ostéoblastes durant le développement et son inactivation chez la souris provoque un retard dans l'ossification des os du crane. Ce phénotype est accompagné par une réduction de l'expression de Runx2, suggérant

que *Msx2* induit directement ou indirectement la transcription de ce gène (Satokata et al., 2000). Les souris déficientes en *Bapx1* présentent également une réduction de l'expression de *Runx2* (Tribioli and Lufkin, 1999). Finalement, l'inactivation du gène *Hoxa-2* provoque une expression ectopique de *Runx2* accompagné d'une ossification anormale du deuxième arc branchiale, suggérant que *Hoxa-2* agit comme un répresseur de *Runx2* (Kanzler et al., 1998). Malgré ces résultats intéressants, les facteurs contrôlant l'expression spatiotemporelle de *Runx2* restent encore à être identifiés.

L'expression de *Runx2* (E10.5) précède de plusieurs jours l'apparition des ostéoblastes (E14.5) lors du développement de la souris (Ducy et al., 1997). Cette observation pourrait être expliquée par trois mécanismes non-exclusifs. D'abord, *Runx2* pourrait contrôler l'expression d'autres facteurs de transcription responsables de la différenciation des ostéoblastes. L'un de ces facteurs est *Osterix* (*Osx*), une protéine à doigts de zinc exprimée dans les précurseurs des ostéoblastes. Son absence chez la souris cause un phénotype similaire à la délétion de *Runx2* (Nakashima et al., 2002). L'expression de *Runx2* n'est pas affectée en absence d'*Osx*, alors qu'*Osx* n'est pas exprimé en absence de *Runx2*, suggérant qu'*Osx* est une cible transcriptionnelle en amont de *Runx2* (Figure 1-6). Un deuxième mécanisme impliquerait que l'activité de transactivation transcriptionnelle de *Runx2* requiert un coactivateur dont l'expression n'apparaît que plus tard dans le développement. À ce jour, il n'existe aucune évidence appuyant cette hypothèse. Finalement, un troisième mécanisme ferait intervenir un régulateur négatif qui entrerait en compétition avec *Runx2* pour le même site de liaison sur l'ADN ou qui empêcherait ce dernier de lier ce site. Les facteurs de transcription *Twist1* et *Twist2*, capables de lier le domaine de liaison à l'ADN de *Runx2* et d'antagoniser ainsi son activité transcriptionnelle, seraient responsables d'un tel mécanisme (Bialek et al., 2004; Yousfi et al., 2002)(Figure 1-6).

En plus de Runx2 et d'Osterix, d'autres facteurs, pas nécessairement exclusifs aux ostéoblastes, sont requis pour la différenciation et l'activité de ces cellules. Parmi ceux-ci nous nommerons Fra-1 et JunB de la famille des facteurs AP-1 (Eferl et al., 2004; Kenner et al., 2004) et ATF4, de la famille des facteurs à boîte CREB (Yang et al., 2004). Ces protéines reconnaissent des éléments en *cis* dans des promoteurs spécifiques aux ostéoblastes et agissent de concert avec d'autres facteurs de transcription pour permettre l'expression des composantes de la matrice osseuse (Figure 1-6). Par exemple, des sites de liaison pour Runx2, ATF4 et AP-1 se trouvent dans le promoteur de l'ostéocalcine et contribuent tous à l'activation transcriptionnelle de ce gène (Yang and Karsenty, 2004; Ducy and Karsenty, 1995).

#### **1.1.2.2. Contrôle paracrine et autocrine de la différenciation et de l'activité des ostéoblastes**

En plus du contrôle intrinsèque exercé par des facteurs de transcription, la différenciation et l'activation de l'ostéoblaste sont régulées par plusieurs facteurs de croissance paracrine et autocrine (Figure 1-6). Cette régulation est importante au cours du développement, lors de la formation des os, et à l'âge adulte afin de maintenir un niveau d'ossification constant.

Présentement, il y a seulement trois facteurs de croissance pour lesquels il existe des évidences génétiques démontrant leur implication directement dans la différenciation des ostéoblastes : indian hedgehog (Inh), le facteur de croissance des fibroblastes Fgf18 et un ou plusieurs des facteurs de la famille Wnt (Figure 1-6). Indian hedgehog, un homologue mammifère du facteur Hedgehog (Hh) de drosophile, est requis pour la différenciation des ostéoblastes lors de l'ossification endochondrale. En effet, l'ablation de ce gène chez la souris se traduit notamment par une absence de cellule Runx2-positives et donc d'ostéoblastes au niveau des éléments du squelette qui sont normalement soumis à l'ossification endochondrale (St Jacques et al., 1999). Le fait que l'ossification intramembranaire n'est pas affectée chez ces souris suggère cependant que d'autres facteurs peuvent induire l'ossification dans les os plats. Inh

agirait en stimulant la prolifération des chondrocytes via le système récepteur/répresseur smoothed (Smo)/patched-1 (Ptc1) (Ingham et al., 2000; Long et al., 2001). Fgf18 aurait l'effet inverse en agissant via le récepteur Fgfr3 afin d'inhiber la prolifération des chondrocytes lors du développement. L'ablation des gènes *Fgf18* et *Fgfr3* chez la souris provoque des phénotypes très similaires d'ossification endochondrale prolongée accompagnée d'une zone de chondrocytes hypertrophiques épaissie dans la plaque de croissance et d'os plus longs (Deng et al., 1996; Liu et al., 2002; Ohbayashi et al., 2002). De même, des mutations activatrices (gain de fonction) dans le récepteur FGFR3 sont responsables de deux types de nanisme chez l'humain, l'achondroplasie et la dysplasie thanatophorique (Naski et al., 1996; Rousseau et al., 1994; Shiang et al., 1994; Tavormina et al., 1995). Ces deux conditions pathologiques sont caractérisées par une réduction importante des chondrocytes non-hypertrophiques, probablement causée par une prolifération réduite de ces cellules. Finalement, des données montrant que la signalisation induite par FGFR3 inhibe l'expression d'Inh suggèrent qu'un lien direct existerait entre les voies antagonistes Inh/Smo et FGF18/FGFR3 (Liu et al., 2002; Naski et al., 1998).

Les facteurs Wnt, les homologues mammifères du gène *Wingless* de drosophile, agissent en liant les récepteurs Frizzled. Suite à l'activation du récepteur Frizzled, la  $\beta$ -caténine, une protéine normalement cytoplasmique ayant une courte demi-vie, est stabilisée et transportée au noyau où elle permet la transcription de gènes cibles. Plusieurs évidences suggéraient déjà que les facteurs de la famille Wnt avaient un rôle à jouer dans la différenciation des ostéoblastes. D'abord, chez l'humain et la souris des mutations dans le gène *LRP5*, l'homologue mammifère du gène *Arrow* de drosophile et un corécepteur de Wnt, causent un phénotype de masse osseuse réduite associé à une réduction de l'ossification. Inversement, des mutations gain de fonction dans le même gène se traduisent par des phénotypes de masse osseuse augmentée chez l'humain. De plus, l'expression ectopique de *Lrp5* dans des fibroblastes potentialise la signalisation par la voie canonique des Wnt (Logan and Nusse, 2004).

Il existe un grand nombre de facteurs Wnt, de récepteurs Frizzled et de corécepteurs Lrp, ce qui n'a pas facilité les études génétiques de cette voie dans les ostéoblastes. Très récemment, une série d'études ont démontré le rôle cruciale que joue la voie canonique des Wnt dans la différenciation des ostéoblastes (Day et al., 2005; Glass et al., 2005; Hill et al., 2005; Hu et al., 2005). Ces études ont tiré avantage du fait qu'il n'existe qu'un seul gène codant pour la  $\beta$ -caténine, la protéine centrale de la voie de signalisation intracellulaire canonique activée par les facteurs Wnt. L'ablation conditionnelle de la  $\beta$ -caténine dans le mésenchyme des membres et de la tête résulte en un blocage de la différenciation des ostéoblastes, mais pas des chondrocytes (Day et al., 2005; Hill et al., 2005). De hauts niveaux de  $\beta$ -caténine et de ses cibles transcriptionnelles, les facteurs Lef et Tcf, sont également observés dans les précurseurs des ostéoblastes *in vivo* (Day et al., 2005; Glass et al., 2005).

La signalisation par les Wnt est également importante dans les ostéoblastes différenciés où elle jouerait un rôle dans le contrôle de l'ostéoclastogénèse. En effet, l'expression d'une forme stabilisée de la  $\beta$ -caténine dans les ostéoblastes différenciés provoque un effet néfaste sur la différenciation des ostéoclastes, résultant en une ostéopétrose sévère (Glass et al., 2005). Les auteurs de cette étude démontrent que ce phénotype ostéopérotique résulte en fait de l'effet positif que la voie Wnt/ $\beta$ -caténine/Tcf-1 a sur la transcription du gène OPG qui codent pour l'ostéoprotégérine un puissant inhibiteur de la différenciation des ostéoclastes. Finalement, une de ces études présente des évidences que les facteurs Hedgehog, dont fait partie Inh, pourraient stimuler l'ostéogénèse en induisant l'expression des ligands Wnt (Hu et al., 2005).

Les membres de la superfamille incluant des facteurs de croissance transformant  $\beta$  (TGF $\beta$ ) et, plus particulièrement, les protéines morphogéniques de l'os (BMP) sont considérés depuis longtemps comme des régulateurs important de l'ostéogénèse et de la différenciation des ostéoblastes (Figure 1-6). Les BMP sont en effet les plus forts inducteurs d'ossification *in vivo*. BMP2, par exemple, peut induire la formation

ectopique d'os lorsqu'il est implanté dans le tissu musculaire (Wozney et al., 1988). De nombreuses évidences expérimentales ont permis de démontrer que plusieurs membres de la famille BMP, leurs récepteurs et leurs antagonistes jouaient des rôles prédominant dans le contrôle de la différenciation des ostéoblastes et dans la production de la matrice osseuse (Balemans and Van Hul, 2002; Zhao et al., 2002; Wu et al., 2003). Le TGF $\beta$  agit plutôt comme un antagoniste des BMP et inhibe l'expression de Runx2 et de l'ostéocalcine (Alliston et al., 2001). La signalisation intracellulaire des BMP et du TGF $\beta$  est activée principalement par les protéines Smad, retrouvées normalement dans le cytoplasme, mais qui sont transportées au noyau suite à leur phosphorylation par un récepteur à activité tyrosine kinase (Massague and Wotton, 2000). Il a été démontré que les Smad pouvaient interagir avec Runx2 pour moduler l'expression des gènes codant pour les composants de la matrice osseuse (Ito and Miyazono, 2003). Malgré tout, le rôle joué par les BMP dans l'ossification reste controversé. En effet, il reste à démontrer si l'extraordinaire capacité qu'ont BMP2, BMP4, BMP6 et BMP7 de pouvoir induire la formation d'os, ne reflète pas plutôt une fonction plus générale d'inducteur du mésoderme squelettique (Capdevila and Izpisua Belmonte, 2001). Des expériences d'ablation génique conditionnelle de ces facteurs ou de leurs récepteurs dans des cellules spécifiques, ostéoblastes et/ou chondrocytes, permettraient probablement de répondre à cette question.

### **1.1.2.3. Contrôle neuroendocrinien de l'activité ostéogénique**

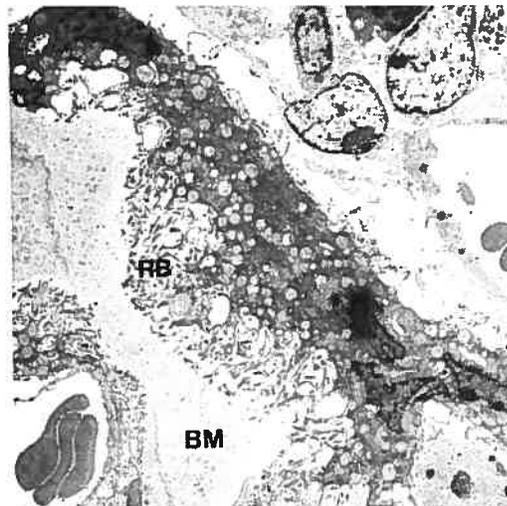
La plupart des fonctions homéostatiques du corps, comme le poids et les fonctions gonadiques, sont soumises à un contrôle endocrine. On a supposé pendant longtemps que la masse osseuse, et plus précisément l'activité des ostéoblastes, étaient également régulée par un mécanisme similaire, sinon commun. Deux observations suggèrent cette hypothèse. Premièrement, la chute des estrogènes mène à une perte de masse osseuse due à une augmentation de l'activité des ostéoclastes qui n'est pas compensé par une augmentation de l'activité des ostéoblastes (Chambers, 2000). Deuxièmement, les individus obèses sont protégés de l'ostéoporose (Felson, 1993).

Une série d'observations, effectuées au cours des dernières années, ont permis de démontrer que l'activité de l'ostéoblaste est contrôlé de façon centrale par un axe formé de la leptine, une hormone sécrétée par les adipocytes, l'hypothalamus et le système nerveux sympathique. Les souris déficientes en leptine (*ob/ob*) ou pour le récepteur à la leptine (*db/db*), en plus d'être obèses et hypogonadiques, présentent une masse osseuse 40% plus importante que les souris sauvages, suggérant que la leptine est une hormone antiostéogénique (Ducy et al., 2000). Des études *in vivo* et *in vitro* ont démontré que la leptine n'agissait pas directement sur les ostéoblastes, qui n'expriment pas de récepteur à la leptine, mais plutôt au niveau du système nerveux central. L'action antiostéogénique de la leptine se produit au niveau des noyaux ventromédians de l'hypothalamus (VMH) qui sont riches en récepteurs à la leptine (Elmqvist et al., 1998). Finalement, le relais entre l'hypothalamus et les ostéoblastes passe par les neurones  $\beta$ -adrénergiques du système nerveux sympathique. De façon très intéressante, il a été démontré que les ostéoblastes expriment des récepteurs  $\beta$ 2-adrénergiques et que des terminaisons nerveuses produisant de l'adrénaline et de la noradrénaline se trouvent près des ostéoblastes dans l'os (Takeda et al., 2002). Ces neurones inhiberaient donc directement les ostéoblastes afin qu'ils synthétisent moins de matrice osseuse. Fait intéressant, ce contrôle affecterait aussi indirectement les ostéoclastes, puisque la signalisation via les récepteurs  $\beta$ 2-adrénergiques induirait une augmentation dans l'expression du facteur ostéoclastogénique RANKL à la surface des ostéoblastes (Elefteriou et al., 2005). L'ensemble de ces évidences suggèrent fortement que l'activité de l'ostéoblaste est soumise à un contrôle neuroendocrinien.

J'ai tenté de démontrer dans cette section, en m'appuyant sur quelques exemples précis, que la différenciation et l'activité des ostéoblastes est un processus complexe, contrôlé à plusieurs niveaux. Nous verrons dans la section suivante qu'il en est de même pour l'ostéoclaste, une cellule très différente pourtant de l'ostéoblaste. Nous verrons en particulier que l'activité et la maturation de l'ostéoclaste dépend en grande partie de l'ostéoblaste.

## 1.2. MÉCANISMES MOLÉCULAIRES RÉGULANT LA DIFFÉRENCIATION ET L'ACTIVITÉ DES OSTÉOCLASTES

Chez les vertébrés, l'ostéoclaste mature est la seule cellule de l'organisme ayant la capacité de résorber la matrice osseuse. Un défaut dans la différenciation ou l'activité de ces cellules résulte donc en de graves maladies osseuses comme l'ostéopétrose, l'ostéoporose, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Paget et les tumeurs ostéolytiques dérivées de certaines métastases (Rodan and Martin, 2000). Dans l'ostéopétrose, une absence d'ostéoclaste ou un défaut dans leur activité de résorption seront responsables de l'accumulation anormale d'os. La plupart des maladies osseuses chez l'adulte, incluant l'ostéoporose, sont plutôt causées par un excès d'activité ostéoclastique, d'où l'intérêt certain que nous avons à mieux comprendre la différenciation et l'activité de cette cellule.



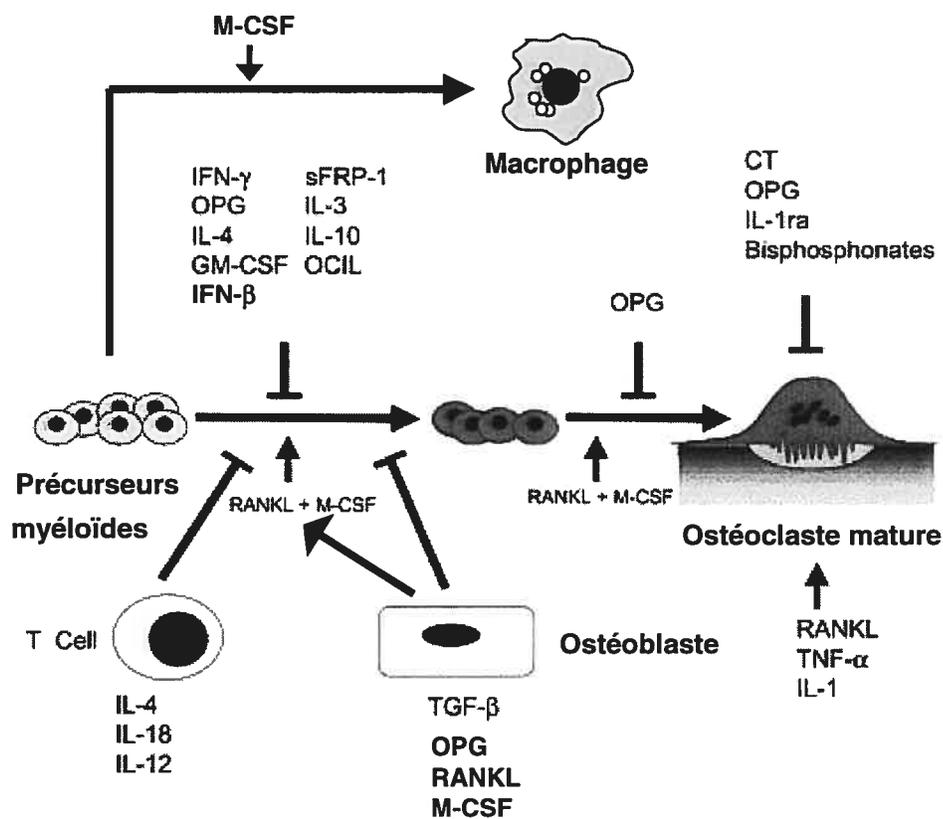
**Figure 1-7. Ostéoclaste *in vivo*.**

Coupe histologique d'un os montrant un ostéoclaste résorbant la matrice osseuse (BM). On remarque les nombreux noyaux à l'intérieur de la cellule, ainsi que la bordure plissée (RB) (Rajapurohitam et al., 2001).

Les ostéoclastes différenciés sont des cellules multinucléées post-mitotiques qui résultent de la fusion de précurseurs mononucléés ou préostéoclastes (Chambers, 2000; Teitelbaum, 2000). L'origine hématopoïétique de ces précurseurs a pu être démontrée par des expériences de transfert de moelle osseuse et, surtout, par des systèmes de coculture *ex vivo* (Takahashi et al., 1988). De plus, l'ablation du facteur de transcription de la famille Ets, PU.1, qui contrôle la différenciation de plusieurs lignées hématopoïétiques, cause une ostéopétrose associée à une absence d'ostéoclastes chez la souris (Tondravi et al., 1997). Un phénotype similaire est observé chez les souris où le gène codant pour le facteur stimulant des macrophages (M-CSF) a été inactivé, suggérant que les préostéoclastes se différencient à partir d'un précurseur myéloïde (Yoshida et al., 1990). L'ostéoclaste pourrait donc être considéré comme un macrophage spécialisé dans la phagocytose de la matrice osseuse. L'ostéoclaste activé se distingue cependant des autres phagocytes par le fait que c'est une cellule hautement polarisée et par l'expression de certaines protéines comme la cathepsine K, le récepteur à la calcitonine et la sous-unité transmembranaire  $\alpha_3$  de 116 kDa de la pompe à proton. La structure la plus remarquable de l'ostéoclaste polarisé est la membrane plissée (ou ruffled border) qui est en fait l'organelle impliquée dans l'activité résorptive de cette cellule (Figure 1.7). L'attachement à la matrice osseuse, la formation de la membrane plissée et l'activité de l'ostéoclaste mature seront abordés plus en détails dans une section subséquente. J'aborderai d'abord les mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation de l'ostéoclaste, plus particulièrement les facteurs paracrines requis pour cette différenciation. Ces facteurs sont en presque totalité produits par les ostéoblastes, ce qui permettra de comprendre l'intime relation qu'entretiennent l'ostéoclaste et l'ostéoblaste. Par la suite j'aborderai plus en détails le système RANK/RANKL/OPG et les voies de signalisation intracellulaires qui sont activées par le récepteur RANK.

### 1.2.1. Facteurs de différenciation des ostéoclastes

Une meilleure compréhension de la différenciation de l'ostéoclaste a émergé suite à une série d'expériences qui ont démontré que la coculture de cellules provenant de moelle osseuse ou de rate de souris avec des cellules stromales, notamment des ostéoblastes primaires, permettait l'obtention d'ostéoclastes matures et capables de résorber la matrice osseuse (Takahashi et al., 1988). Un contact étroit entre les cellules stromales et les précurseurs hématopoïétiques des ostéoclastes est essentiel à l'ostéoclastogenèse, suggérant que des facteurs produits par les cellules stromales stimulent ce processus. Il est maintenant connu que les ostéoblastes sont responsables de la production de deux facteurs qui sont à la fois nécessaires et suffisants à l'ostéoclastogenèse, le facteur RANKL de la superfamille des TNF, et le facteur de croissance des macrophages M-CSF (Yasuda et al., 1998; Lacey et al., 1998). Ensemble, le M-CSF et RANKL sont requis pour induire l'expression de gènes spécifiques aux ostéoclastes comme ceux qui codent pour la phosphatase acide tartrate-résistante (TRAP), la protéase cathepsine K (CATK), le récepteur à la calcitonine (CTR) et les sous-unités  $\alpha_v$  et  $\beta_3$  des intégrines (Lacey et al., 1998). J'aborderai dans les deux sections suivantes les effets de ces deux facteurs sur les précurseurs des ostéoclastes et sur les ostéoclastes matures. Une troisième section survolera le rôle joué par d'autres facteurs comme le  $\text{TNF}\alpha$ , l'interféron gamma ( $\text{INF}\gamma$ ) et une nouvelle classe de récepteurs « immunoglobuline-like » associés aux protéines à domaine ITAM  $\text{Fc}\gamma$  et Dap12.



**Figure 1-8. Facteurs impliqués dans la différenciation et l'activation des ostéoclastes.**

Les cellules impliquées dans la production de certains de ces facteurs sont également représentées (Quinn and Gillespie, 2005).

### 1.2.1.1. M-CSF

Le facteur de croissance des macrophages (M-CSF ou CSF1) est produit par les ostéoblastes et les cellules stromales de la moelle osseuse à la fois sous une forme soluble et transmembranaire. Lorsqu'il agit seul, le M-CSF est un facteur essentiel à la prolifération, à la différenciation et à la survie des macrophages (Cecchini et al., 1994)(Figure 1-8). Par contre, en combinaison avec RANKL, l'une ou l'autre des deux formes de M-CSF peut induire l'ostéoclastogenèse sur des précurseurs monocytaires (Yao et al., 2002). Le rôle essentiel joué par le M-CSF dans l'ostéoclastogenèse fut établi par l'étude de la souris ostéopétrotique *op/op* qui

présente une mutation inactivant le gène codant pour ce facteur. Ces souris, en plus de présenter une réduction du nombre de macrophages tissulaire, n'ont pas d'ostéoclastes matures et ne répondent pas à la greffe de moelle osseuse, indiquant un défaut qui n'est pas autonome aux cellules ostéoclastiques (Yoshida et al., 1990). Curieusement, les lésions ostéopétroriques des souris *op/op* disparaissent spontanément avec l'âge. Cette rémission reflète une compensation progressive par d'autres cytokines de la même famille, probablement GM-CSF, VEGF ou Flt3L (Niida et al., 1999; Myint et al., 1999). En effet, d'autres récepteurs à tyrosine kinase, incluant c-kit, c-met et flt3 de la même famille que c-fms, le récepteur du M-CSF, sont présents à la surface des préostéoclastes et peuvent induire des voies de signalisation similaires (Gattei et al., 1996; Grano et al., 1996; Lean et al., 2001). Bien que ces facteurs et ces récepteurs puissent se substituer au couple M-CSF/c-fms, on retiendra que seule l'ablation de l'un de ces deux derniers gènes à un effet marqué sur l'ostéoclastogenèse *in vivo* chez la souris, indiquant le rôle unique joué par le M-CSF dans ce processus.

Le M-CSF agit sur les préostéoclastes en stimulant leur prolifération et leur survie. Cette cytokine agit également sur l'activité des ostéoclastes matures en stimulant la motilité, l'étalement (« spreading ») et l'organisation du cytosquelette (Insogna et al., 1997). Ces événements requièrent l'association du protooncogène c-src et de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3 kinase) avec c-fms (Insogna et al., 1997; Grey et al., 2000). Conséquemment, l'ablation des gènes codant pour c-src ou c-fms conduit également à un phénotype ostéopétrorique (Soriano et al., 1991; Dai et al., 2002). Le récepteur c-fms possède une activité tyrosine kinase qui permet son autophosphorylation, une prémisses essentielle au recrutement d'effecteurs intracellulaires. En fait, l'étude de la signalisation en aval de c-fms a été relativement délaissée depuis quelques années suite à la découverte du récepteur RANK qui a monopolisé les travaux portant sur les voies de signalisation dans les ostéoclastes.

Comme mentionné plus haut, la phosphorylation de certains résidus tyrosine de la région cytoplasmique de c-fms est essentielle à la transmission du signal induit par la liaison de c-fms au M-CSF. On sait que la phosphorylation de la tyrosine 559 de la queue cytoplasmique de c-fms permet le recrutement de membres de la famille des kinase Src qui activent les signaux impliqués à la fois dans la différenciation et dans l'activation des ostéoclastes. Par contre la phosphorylation de la tyrosine 807 de c-fms est requise uniquement pour la différenciation (Feng et al., 2002). Fait intéressant, la protéine adaptatrice liant ce résidu phosphorylé est toujours inconnue. Des événements de signalisation en aval du récepteur dépendent également de c-Cbl et de p130<sup>Cas</sup> qui activent respectivement la signalisation nucléaire et une interaction avec la signalisation démarrée par l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  (Nakamura et al., 2003). p130<sup>Cas</sup> est impliqué dans des complexes reliés au remaniement du cytosquelette d'actine et pourrait donc être impliqué dans la migration et l'étalement de l'ostéoclaste induite par le M-CSF (Nakamura et al., 1998). c-Cbl est requis pour l'activation de la PI3 kinase par c-fms et la signalisation en aval impliquerait certaines des kinases mitogéniques (MAPK) et la voie AKT qui serait responsable de l'effet anti-apoptotique du M-CSF (Husson et al., 1997). c-cbl joue également un rôle négatif sur le récepteur c-fms en induisant son ubiquitination, son internalisation et sa dégradation (Mancini et al., 2002).

Au niveau transcriptionnel, on sait que le récepteur c-fms peut induire la transcription du gène codant pour Fos, ce qui est également le cas pour RANK. L'importance de ce facteur de transcription dans la différenciation des ostéoclastes fut encore une fois démontrée par des expériences d'ablation génique chez la souris. Les souris Fos<sup>-/-</sup> développent une ostéopétrose très sévère caractérisée par une absence complète d'ostéoclastes (Grigoriadis et al., 1994). En accord avec l'effet prolifératif du M-CSF, l'activation de c-fms serait également impliquée dans l'entrée dans le cycle cellulaire et la progression en phase G1 (Roussel, 1997). Finalement, l'un des effets majeurs du M-CSF sur les préostéoclastes est sa capacité à induire directement l'expression de

RANK à la surface de ces cellules, potentialisant ainsi l'effet ostéoclastogénique de RANKL (Arai et al., 1999).

### **1.2.1.2. RANKL**

Le ligand du récepteur activateur de  $\text{NF}\kappa\text{B}$  (RANKL) est un facteur critique à plusieurs stades de l'ostéoclastogenèse (Kong et al., 1999; Lacey et al., 1998). L'ablation génique chez la souris de RANKL ou de son récepteur RANK conduit invariablement à un phénotype ostéopétrotique accompagné d'une absence complète d'ostéoclaste (Kong et al., 1999). RANKL joue de multiples rôles à différentes étapes de l'ostéoclastogenèse incluant l'induction de l'expression de gènes spécifiques aux ostéoclastes, la fusion des précurseurs afin de former des polykarions, la survie des ostéoclastes matures et l'activité résorptive de ces derniers. Ces multiples rôles résultent en fait de l'activation de plusieurs voies de signalisation par RANK. Comme il s'agit d'un des sujets importants abordés dans cette thèse, le système RANK/RANKL/OPG et la signalisation moléculaire démarrée par RANK seront abordés plus en détails dans la section 1.2.2.

### **1.2.1.3. $\text{TNF}\alpha$ , interféron gamma et beta, récepteurs immunoglobuline-like et autres facteurs**

Bien que le M-CSF et RANKL soient les deux facteurs clés de la différenciation des ostéoclastes, d'autres facteurs peuvent moduler de façon positive ou négative ce processus, aussi bien dans des conditions normales que dans certaines conditions pathologiques (voir figure 1.8, p. 21). Comme c'est le cas pour RANKL et M-CSF, certains de ces facteurs sont produits par les ostéoblastes. D'autres, par contre, sont sécrétés par des cellules immunitaires comme les macrophages et les cellules T, souvent dans un contexte pathologique d'inflammation. L'étude de ce nouveau lien

entre le système immunitaire et l'ostéoclastogenèse s'appelle ostéoimmunologie (Takayanagi, 2005). J'aborderai dans cette section l'effet de certains de ces facteurs, notamment le rôle très intéressant d'une nouvelle classe de récepteurs « immunoglobuline-like » associés aux protéines à domaine ITAM.

Comme RANKL, le facteur TNF $\alpha$  (Tumor necrosis factor alpha) est un membre de la superfamille des facteurs TNF. Le récepteur du TNF $\alpha$  (TNF $\alpha$ R) est présent à la surface des ostéoclastes et de leurs précurseurs, et peut activer certaines des voies de signalisation normalement activées par RANK, incluant la voie NF $\kappa$ B (Azuma et al., 2000). *In vitro* le TNF $\alpha$  peut stimuler l'ostéoclastogenèse en présence ou en absence de RANKL, suggérant que ce facteur pourrait avoir un impact sur ce processus *in vivo* (Lam et al., 2000). En fait, on croit que l'effet du TNF $\alpha$  sur les ostéoclastes serait plus important dans certaines maladies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde où il a été démontré que le TNF $\alpha$  était produit en grande quantité au site d'inflammation (Fujikawa et al., 2001). Dans l'arthrite rhumatoïde on observe une destruction de l'os qui est causée par un recrutement et une formation aberrante d'ostéoclastes aux sites d'inflammation. Les cellules immunitaires présentent dans les articulations touchées, principalement des cellules T activées produisant du RANKL et des macrophages sécrétant du TNF $\alpha$  et de l'interleukine-1 (IL-1), seraient responsables de cette ostéoclastogenèse anormale (Feldmann, 2001). Il a été démontré que l'IL-1 peut également se substituer au RANKL ou à tout le moins potentialiser son action en activant certaines voies de signalisation dont celles des MAP kinases Erk et de la PI3 kinase (Lee et al., 2002c). Les effets similaires sur l'ostéoclastogenèse qu'ont RANKL, l'IL-1, le TNF $\alpha$  et CD40, un autre membre de la superfamille de TNF, sont en fait le résultat d'une signalisation intracellulaire partagée par leur récepteur respectif. Ces récepteurs ne possèdent pas d'activité kinase intrinsèque et doivent donc recruter des protéines adaptatrices afin d'activer des kinases intracellulaires. IL-1R par exemple, fait appel aux kinases IRAK (IL-1R-associated kinase) qui participent ensuite à l'activation des TRAF (Li et al., 2005). La

protéine adaptatrice TNF receptor associated factor 6 (TRAF6) joue un rôle prépondérant dans l'activation des voies en aval des récepteurs RANK, IL-1R, TNF $\alpha$ R et CD40. L'inactivation du gène codant pour TRAF6 chez la souris résulte en un phénotype ostéopétritique et une signalisation inefficace des récepteurs mentionnés plus haut (Lomaga et al., 1999). Si tous ces récepteurs de la superfamille TNF peuvent activer les mêmes voies de signalisation et supporter l'ostéoclastogénèse *in vitro*, on peut se demander pourquoi l'ablation des gènes codant pour RANK ou RANKL suffit à causer l'ostéopérose chez la souris? Pourquoi l'absence de signalisation par RANK n'est-elle pas compensée par un autre récepteur, comme TNF $\alpha$ R? Une étude récente répond en partie à cette question en démontrant que la signalisation intracellulaire initiée par RANK est beaucoup plus forte que celle initiée par CD40, notamment par un recrutement plus important de TRAF6. L'ostéoclastogénèse nécessite donc un niveau seuil d'activation de TRAF6 que seul RANK est capable de fournir dans des conditions physiologiques normales (Gohda et al., 2005).

Un autre membre de la superfamille des TNF, TRAIL, agit plutôt de façon négative sur les précurseurs des ostéoclastes et donc, sur l'ostéoclastogénèse. Dans ce cas TRAIL, en se liant à son récepteur, TRAIL-R, à la surface des préostéoclastes, entrainerait un blocage de l'activité de la voie p38 MAPK, normalement activée par RANK (voir section 1.2.2.2.2.2.). Il est intéressant de noter que TRAIL n'as pas d'effet marqué sur l'activation de la voie NF $\kappa$ B par RANK, ce qui suggère que la différenciation des ostéoclastes n'est pas stimulée uniquement par cette voie de signalisation, mais requiert également l'activation des MAPK Erk, Jnk ou p38 (Zauli et al., 2004).

Plusieurs autres cytokines ont des effets négatifs sur l'ostéoclastogénèse induite par RANKL en interférant avec les voies de signalisation activées par RANK. Parmi celles-ci on retrouve les interférons gamma et beta (IFN- $\gamma$  et IFN- $\beta$ ). Il a été montré que l'IFN- $\gamma$ , produit par certaines cellules T, pouvait avoir un effet négatif sur

l'ostéoclastogenèse induite par RANKL. Cet effet se produirait via un mécanisme de signalisation croisée (cross-talk) entre les voies de signalisation activées par IFNGR (INF- $\gamma$  receptor), le récepteur de l'IFN- $\gamma$ , et celles activées par RANK. IFNGR active une voie dépendant des Janus kinases Stat1 qui conduit à la dégradation rapide de TRAF6 ce qui explique l'inhibition de l'effet de RANKL par l'IFN- $\gamma$  (Takayanagi et al., 2000). L'interleukine-4 (IL-4), une autre cytokine sécrétée par les cellules T et un inhibiteur de la maturation des macrophages et des ostéoclastes *in vitro*, a un effet très similaire sur les précurseurs des ostéoclastes en provoquant également la dégradation de TRAF6 (Mirosavljevic et al., 2003).

Récemment, un groupe de chercheurs a pu mettre en évidence l'existence d'une boucle de régulation autocrine dans les ostéoclastes impliquant l'IFN- $\beta$ . RANKL, via son récepteur RANK, induit l'expression de Fos, un facteur de transcription essentiel à la différenciation des ostéoclastes (voir section 1.2.2.2.2.). Le gène codant pour l'IFN- $\beta$  est transcrit de façon Fos dépendante suite à la stimulation des ostéoclastes par RANKL. L'IFN- $\beta$  ainsi produit est sécrété par l'ostéoclaste lui-même afin d'aller lier son récepteur, IFNAR (INF- $\alpha$  receptor), de façon autocrine à la surface de l'ostéoclaste. L'activation du récepteur IFNAR provoque l'activation d'une cascade de signalisation dépendant de Stat1, Stat2 et d'IRF-9 qui culmine par la dégradation protéique de Fos (Takayanagi et al., 2002b). Ce mécanisme permettrait de contrôler l'homéostasie osseuse en empêchant une réponse soutenue et incontrôlée au RANKL. En plus de leur effet négatif direct sur la signalisation induite par RANK, l'IFN- $\gamma$  et l'IFN- $\beta$ , ont probablement des effets plus complexes sur les ostéoclastes. Ces cytokines ont en effet la capacité de stimuler la transcription de gènes codant pour de nombreuses cytokines qui pourraient avoir d'autres effets sur l'ostéoclaste.

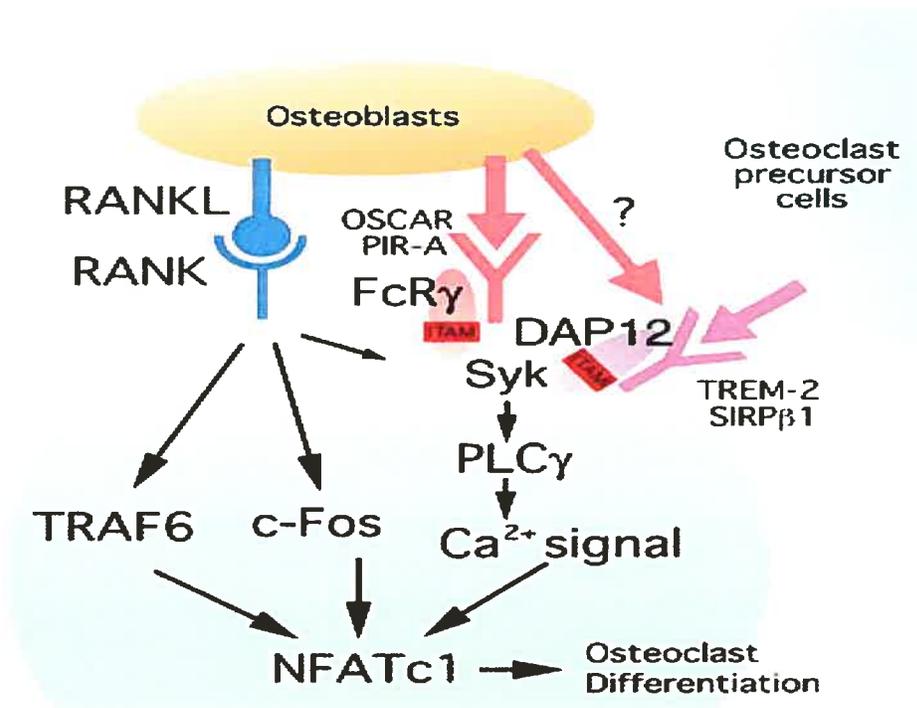
J'ai déjà mentionné à plusieurs reprises dans ce chapitre que l'ostéoclastogenèse peut-être reproduite *in vitro* en présence de deux facteurs essentiels et suffisant, RANKL et M-CSF. Bien que largement accepté depuis plusieurs années, ce

paradigme est remis en question par des observations récentes. Plusieurs chercheurs ont d'abord noté qu'il est très difficile d'obtenir des ostéoclastes à partir de population de préostéoclastes humains purifiés (CD14+) en ajoutant uniquement du RANKL et du M-CSF. En fait, il apparaît que, plus les conditions sont contrôlées, moins l'ostéoclastogenèse *in vitro* est efficace. De plus, la présence de sérum dans le milieu apparaît essentielle au succès de ces cultures, suggérant que le sérum contient des facteurs supplémentaires requis pour la différenciation (Susa et al., 2004). Ces résultats, bien que variables d'un laboratoire à l'autre, suggèrent fortement que l'ostéoclastogenèse requière au moins une troisième voie d'activation afin d'avoir lieu. Il est fort probable que cette troisième voie est activée par au moins un facteur présent à la surface de l'ostéoblaste ou d'une autre cellule stromale du microenvironnement osseux. Publiées au cours des trois dernières années, une série d'études élégantes tend à démontrer qu'un groupe de récepteurs « immunoglobuline-like » associés à des protéines à domaine ITAM serait impliqué dans l'activation de cette troisième voie.

Les protéines à domaine ITAM sont des protéines adaptatrices membranaires impliquées dans la transduction de signaux à partir de récepteurs « immunoglobuline-like » présents à la surface des cellules de la lignée myéloïde, incluant les monocytes, les granulocytes et les macrophages, mais également à la surface des cellules NK (natural killer) (Takai, 2002). Les ligands de ces différents immunorécepteurs sont très variables et incluent l'ADN double brin, les glycoprotéines, certains composants bactériens comme les lipopolysaccharides, et d'autres immunorécepteurs (Cerwenka and Lanier, 2001). Les ostéoclastes dérivent de précurseurs de la lignée myéloïde et expriment nombre d'immunorécepteurs de ce type. L'implication de ces récepteurs dans la différenciation des ostéoclastes a d'abord été suggérée par le phénotype ostéopétrotique observé chez la souris déficiente en DAP12 (DNAX-activating protein). DAP12 est une protéine transmembranaire à domaine ITAM qui active la relâche de calcium dans les cellules immunitaires. L'ostéoclastogenèse des précurseurs *DAP12*<sup>-/-</sup> est déficiente *in vitro* en présence de RANKL et de M-CSF

(Kaifu et al., 2003), cependant elle est tout à fait fonctionnelle en coculture en présence d'ostéoblastes. De plus, le phénotype ostéopérotique de cette souris est subtil et le nombre d'ostéoclastes est normal *in vivo*, suggérant une compensation de la perte de DAP12 par un deuxième signal présenté par les ostéoblastes (Koga et al., 2004).

Cette nouvelle voie de signalisation s'avérait complexe, mais les études menées par la suite ont permis de suggérer un modèle relativement clair (Figure 1.9). D'abord deux paires de corécepteurs de type immunoglobuline-like seraient impliquées dans l'activation de cette voie : OSCAR/PIR-A et TREM-12/SIRP $\beta$ 1 (Takayanagi, 2005). Les ligands naturels de ces récepteurs n'ont pas encore été identifiés, cependant des indices expérimentaux suggèrent que le ligand de OSCAR/PIR-A est exclusivement exprimé par les ostéoblastes alors que le ligand de TREM-12/SIRP $\beta$ 1 est exprimé par les préostéoclastes eux-mêmes. Quoiqu'il en soit, la stimulation de ces récepteurs avec un anticorps spécifique accélère l'ostéoclastogenèse en réponse au RANKL, indiquant l'importance de ces récepteurs dans ce processus. Cependant, en absence de RANKL, la stimulation de ces récepteurs ne suffit pas seule à induire la différenciation, suggérant que les signaux enclenchés par ces récepteurs agissent de façon coopérative avec ceux activés par RANKL, mais qu'ils ne peuvent s'y substituer. La transduction du signal à partir de chacun de ces récepteurs implique leur association avec une protéine à domaine ITAM spécifique pour chacun des deux récepteurs. DAP12 s'associerait à TREM-12/SIRP $\beta$ 1, alors que FcR $\gamma$  s'associerait à OSCAR/PIR-A. Le rôle essentiel joué par ces deux protéines à domaine ITAM dans l'ostéoclastogenèse est démontré par le phénotype de la souris double mutante *DAP12<sup>-/-</sup>FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup>*. Ces souris présentent une ostéopérose très sévère et une absence d'ostéoclastes *in vivo* et *in vitro*, que ce soit en coculture avec des ostéoblastes ou avec l'ajout de RANKL et de M-CSF (Mocsai et al., 2004; Koga et al., 2004). Le défaut de différenciation de ces cellules peut cependant être corrigé par le transfert rétroviral d'un gène DAP12 normal, indiquant que DAP12 peut se substituer à FcR $\gamma$ .



**Figure 1-9. Coopération entre les signaux induits par RANKL et les protéines à domaine ITAM afin d'induire la différenciation des ostéoclastes.**

La phosphorylation des ITAM stimulée par RANK favorise le recrutement de la kinase Syk, provoquant l'activation de la phospholipase C  $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) et la relâche de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ). La signalisation par le calcium est critique pour l'induction de NFATc1. Des signaux activés par RANKL et faisant intervenir TRAF6 et Fos sont aussi importants afin d'activer la transcription de NFATc1. Les immunorécepteurs associés avec FcR $\gamma$  sont activés exclusivement par des ligands présents à la surface des ostéoblastes, alors que ceux associés avec DAP12 sont activés par des ligands exprimés à la surface des ostéoclastes eux-mêmes (et possiblement par des ligands présents sur les ostéoblastes) (Takayanagi et al. 2005).

La cascade de signalisation initiée par DAP12 et FcR $\gamma$  implique le recrutement et l'activation de la tyrosine kinase Syk qui phosphoryle et active par la suite la phospholipase C gamma (PLC $\gamma$ ). La PLC $\gamma$  est une enzyme clef de la voie du calcium, puisque c'est elle qui génère l'inositol 1,4,5-triphosphate ( $\text{IP}_3$ ). L' $\text{IP}_3$  en se liant à son récepteur (IP3R) localisé à la membrane du réticulum endoplasmique induit la relâche d'ion  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme. La concentration accrue de calcium cytoplasmique est responsable de l'activation de la protéine phosphatase calcineurine. Cette dernière a notamment pour cible NFATc1 qu'elle déphosphoryle à plusieurs sites, permettant ainsi l'exposition du signal de localisation nucléaire de NFATc1 et

sa translocation au noyau (Figure 1.9). Cette activation de NFATc1 par les signaux concertés des récepteurs « immunoglobuline-like » et de RANK est probablement l'un des événements les plus importants de la différenciation des ostéoclastes. Le rôle clef de ce facteur de transcription dans l'ostéoclastogenèse sera abordé plus en détail dans la section 1.2.2.2.3.

Nous venons de voir que de nombreux récepteurs et ligands peuvent influencer la différenciation et la survie des ostéoclastes. Il est plus que probable que beaucoup d'autres restent encore à être découverts. Il est possible également que des facteurs déjà connus pour leurs implications dans l'activité d'autres types cellulaires soient également impliqués dans l'ostéoclastogenèse. Par exemple, un article récent suggère que les récepteurs cannabinoïdes CB1 et CB2 contrôlent la survie et l'activité des ostéoclastes (Idris et al., 2005). L'inactivation du gène CB1 chez la souris cause une augmentation de la masse osseuse et, *in vitro*, des antagonistes des récepteurs CB1 et CB2 inhibent l'ostéoclastogenèse et induisent l'apoptose des ostéoclastes différenciés. Ces résultats suggèrent qu'il est possible d'influencer la résorption osseuse par d'autres composés, dans ce cas des antagonistes du système endocannabinergique, ce qui ouvre la porte au développement de nouveaux traitements contre l'ostéoporose.

Nous avons également vu dans cette section qu'une troisième voie de signalisation impliquant les protéines à domaine ITAM FcR $\gamma$  et DAP12 est requise pour l'ostéoclastogenèse *in vivo*. Cependant, les résultats démontrant cette implication sont récents et d'autres expériences restent à faire afin d'identifier notamment les ligands des récepteurs OSCAR/PIR-A et TREM-12/SIRP $\beta$ 1 et leur mode précis d'activation. RANKL a été identifié en tant que facteur essentiel de la différenciation des ostéoclastes il y a de cela plusieurs années. Depuis, de nombreuses études ont porté sur les voies de signalisation activées par son récepteur, RANK, et sur l'effet biologique de RANKL. Comme il s'agit d'un sujet important de cette thèse, les

prochaines sections traiteront plus en détails du système RANK/RANKL/OPG et de la signalisation moléculaire en aval du récepteur RANK.

#### 1.2.1.4. Fusion

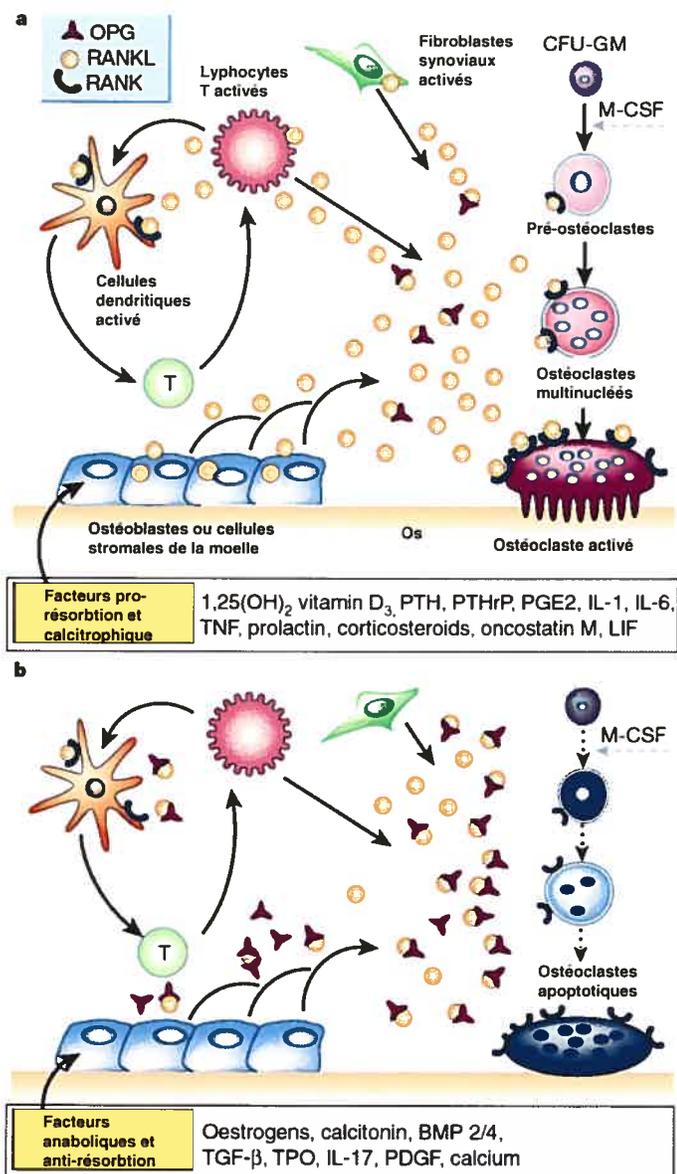
Une étape importante de la différenciation terminale des ostéoclastes est la fusion des préostéoclastes afin de former l'ostéoclaste mature et multinucléé. La fusion est un des mécanismes moléculaires les moins bien connus de l'ostéoclastogenèse. D'après quelques publications, plus ou moins récentes, la fusion des préostéoclastes serait un mécanisme apparenté à celui qui permet de générer à partir de macrophages mononucléés des cellules géantes multinucléées. Des récepteurs et des ligands présents à la surface des préostéoclastes et des monocytes ont été impliqués dans ces deux mécanismes. Notamment, il a été montré à l'aide d'anti-corps bloquant la E-Cadherine que cette protéine était requise pour la fusion des ostéoclastes (Mbalaviele et al., 1995). Il a été montré également que le récepteur DC-STAMP (dendritic cell-specific transmembrane protein) à sept domaines transmembranaires était requis pour la fusion des ostéoclastes *in vivo* (Yagi et al., 2005). Finalement, la fusion serait également contrôlée au niveau transcriptionnel, puisque les souris homozygotes pour un allèle semidominant de Mitf (*Mitf<sup>mi</sup>/Mitf<sup>mi</sup>*), un facteur de transcription leucine zipper-bHLH, présentent des ostéoclastes différenciés, mais mononucléés (Thesingh and Scherft, 1985) (voir aussi section 1.2.2.2.2.).

## 1.2.2. Le système RANKL/RANK/OPG

Les ostéoclastes se différencient à partir d'un précurseur commun aux monocytes et aux macrophages. Par contre, le ou les signaux requis pour l'ostéoclastogenèse, étaient inconnus il y a seulement quelques années encore. Des progrès dans l'identification de ces signaux ont été faits lorsque des chercheurs ont pu reproduire l'ostéoclastogenèse *in vitro* dans des systèmes de culture cellulaire combinant des ostéoblastes et des monocytes. Une étape majeure dans la compréhension de ce processus a été franchie lors de l'identification de RANKL en tant que facteur clef dans la différenciation de l'ostéoclaste. Des découvertes successives ont permis de découvrir que ce facteur faisait partie d'un axe de régulation paracrine qui inclut trois composants moléculaires : un ligand, RANKL, un récepteur, RANK, et un récepteur sécrété et inhibiteur, ostéoprotégérine (OPG).

### 1.2.2.1. Fonction et composants

Les composants de l'axe RANKL/RANK/OPG font tous partie de la superfamille des récepteurs et des ligands apparentés aux TNF (TNFSF et TNFRSF). Chez la souris RANKL, RANK et OPG sont codés respectivement par les gènes *Tnfsf11*, *Tnfrsf11a* et *Tnfrsf11b*. La fonction principale de ce système chez les mammifères est d'induire la différenciation des ostéoclastes (Figure 1.10). Cependant, RANK, RANKL et OPG sont également impliqués dans l'organogenèse des ganglions lymphatiques, dans la survie des cellules dendritiques, la différenciation des lymphocytes et dans le développement des glandes mammaires (Theill et al., 2002; Takahashi et al., 1999). Je n'aborderai pas ces fonctions ici, puisqu'elles dépassent le cadre de cette thèse. De plus, l'étude du système RANKL/RANK/OPG s'est faite principalement dans le contexte de l'ostéoclastogenèse.



**Figure 1-10 . Mécanismes d'action des différents composants de l'axe RANKL/RANK/OPG.**

Les facteurs pro-résorption et calcitrophiques agissent sur les ostéoblastes en induisant la production de RANKL (a). Dans certaines conditions RANKL peut aussi être produit par des lymphocytes T actifs et des fibroblastes synoviaux actifs. RANKL favorise la différenciation, la survie et l'activité des ostéoclastes et des cellules dendritiques. L'ostéoprotégérine (OPG) est induite par les facteurs anaboliques et anti-résorption (b). L'OPG se lie au RANKL qu'elle neutralise, provoquant un blocage dans l'ostéoclastogénèse et une réduction dans la survie et l'activité des ostéoclastes déjà différenciés (Boyle et al., 2003).

RANKL (aussi connu sous le nom de OPGL, ODF et TRANCE) est principalement exprimé sous la forme d'une protéine transmembranaire de type II à la surface des cellules stromales de la moelle osseuse, incluant les ostéoblastes (Lacey et al., 1998; Wong et al., 1997). La nature membranaire de RANKL explique en grande partie pourquoi les précurseurs ostéoclastiques requièrent un contact cellule-cellule avec les ostéoblastes afin de se différencier. La forme membranaire de RANKL peut également être relâchée dans le milieu extracellulaire suite à une protéolyse spécifique. La forme de RANKL ainsi produite est appelé RANKL soluble (sRANKL). La perte d'expression de RANKL (*Tnfsf11*<sup>-/-</sup>) chez la souris cause un phénotype ostéopérotique accompagné d'une absence d'ostéoclastes (Kong et al., 1999). Plusieurs facteurs et hormones cataboliques qui stimulent la résorption *in vivo* agissent en fait en stimulant l'expression de RANKL par les ostéoblastes. C'est le cas notamment de la 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamine D<sub>3</sub>, de l'hormone parathyroïdienne (PTH), de la prostaglandine E<sub>2</sub>, de l'IL-1 et -6 et du TNFα (Hofbauer et al., 2000) (Theill et al., 2002).

RANKL agit sur les précurseurs des ostéoclastes en se liant à son récepteur, RANK. RANK est un récepteur transmembranaire exprimé par les précurseurs hématopoïétiques des ostéoclastes. La signalisation intracellulaire en aval du récepteur RANK est en grande partie responsable de la différenciation et de l'activité des ostéoclastes. En effet, les souris déficientes en RANK (*Tnfrsf11a*<sup>-/-</sup>) sont une phénocopie des souris déficientes en RANKL (*Tnfsf11*<sup>-/-</sup>) et ostéopérotiques, indiquant le rôle prépondérant de ce couple ligand-récepteur dans le remodelage osseux (Li et al., 2000).

L'ostéoprotégérine (OPG, aussi connu sous le nom d'OCIF) est la troisième molécule impliquée dans cet axe. En fait, c'est l'identification d'OPG en tant qu'inhibiteur de l'ostéoclastogenèse qui a mené à la découverte du système RANKL/RANK/OPG (Simonet et al., 1997). OPG est une protéine soluble sécrétée par les ostéoblastes qui inhibe la formation des ostéoclastes *in vitro* et la résorption osseuse *in vivo*. OPG est

en fait un récepteur non-membranaire de la superfamille TNFR qui contrôle la densité et la masse osseuse chez les mammifères (Yasuda et al., 1998). L'administration intraveineuse d'OPG à des modèles animaux peut également réduire de façon importante la résorption osseuse dans des conditions pathologiques comme l'ostéoporose (Morony et al., 1999). La seule fonction connue d'OPG est de lier RANKL, empêchant ainsi la liaison de RANKL à son récepteur RANK. Les motifs TNFR d'OPG sont essentiels à sa liaison avec RANKL (Lacey et al., 1998; Yasuda et al., 1998). La surexpression d'OPG dans des souris transgéniques inhibe la production d'ostéoclastes et résulte en un phénotype ostéopétrotique. Inversement, l'ablation du gène *Tnfrsf11a* qui code pour OPG chez la souris, provoque un remodelage osseux accéléré, une perte de masse osseuse et l'ostéoporose (Lacey et al., 1998; Yasuda et al., 1998). Comme c'est le cas pour RANKL, l'expression d'OPG par les ostéoblastes est strictement contrôlée. Dans ce cas, ce sont des facteurs anaboliques ou anti-résorption qui favorisent l'expression d'OPG. Parmi ceux-ci, on retrouve l'œstrogène, les BMP 2 et 4, le TGF $\beta$ , l'IL-17, le PDGF, le calcium et certaines protéines Wnt (Glass et al., 2005; Schoppet et al., 2002).

L'importance du système RANKL/RANK/OPG chez l'humain a été démontrée par l'identification de mutations dans les gènes codant pour RANK et OPG. Ces mutations sont associées à deux conditions pathologiques héréditaires, la maladie de Paget et l'ostéolyse familiale.

L'ostéolyse familiale est une maladie héréditaire dominante caractérisée par une perte rapide de masse osseuse. On a pu montrer qu'une duplication en tandem d'une région de 18 paires de bases (pb) dans l'exon 1 du gène *TNFRSF11A*, qui code pour le peptide signal de RANK, était responsable de ce syndrome chez au moins trois familles différentes (Hughes et al., 2000). Une mutation similaire correspondant à une duplication en tandem de 27 pb dans la région codant pour le peptide signal de RANK a été identifiée comme étant responsable d'un type de la maladie de Paget très sévère (Haslam et al., 1998). Ces deux mutations ont pour effet d'empêcher le clivage

du peptide signal de RANK ce qui réduit la quantité de RANK qui parvient à la membrane et séquestre le récepteur dans le compartiment intracellulaire. Ce défaut semble provoquer une activation constitutive de RANK indépendante de son ligand, puisque l'activité de NFκB est augmentée dans des cellules transfectées avec ces mutants de RANK (Hughes et al., 2000). Ces mutations peuvent donc être considérées comme des mutations gain de fonction.

La délétion du gène *TNFRSF11B* qui code pour OPG chez certains familles Navajo a été identifiée comme étant responsable d'une forme récessive et juvénile de la maladie de Paget (Whyte et al., 2002; Hofbauer and Schoppet, 2002; Janssens et al., 2005). Chez ces patients, les niveaux d'OPG sont indétectables, alors que les niveaux de RANKL libre et donc actif sont augmentés de façon importante. Dans ce cas, l'absence d'OPG est responsable de la résorption osseuse incontrôlée caractéristique de la maladie de Paget. La délétion des trois paires de bases codant pour l'aspartate 182 d'OPG est responsable de la maladie de Paget chez une famille iraquienne (Cundy et al., 2002). Dans ce cas, OPG est détectée à des niveaux normaux dans le sérum, mais on pense que la délétion de l'aspartate 182 nuit au repliement correct de la protéine et à son interaction avec RANKL.

#### **1.2.2.2. Signalisation moléculaire par RANK**

Nous venons de voir que l'activation du récepteur RANK par RANKL est essentielle à la différenciation et à l'activité des ostéoclastes, tant chez la souris que chez l'humain. Nous avons également vu que l'OPG est un régulateur négatif de ces processus qui agit en bloquant l'action de RANKL. De nombreuses études publiées aux cours des cinq dernières années ont permis de mettre en évidence que RANK, une fois activé suite à sa liaison à RANKL, était responsable de la transduction de multiples signaux associés à la différenciation, à la survie et à l'activité des

ostéoclastes. Les prochaines sections aborderont les cascades moléculaires activées par RANK.

#### 1.2.2.2.1. Activation du récepteur RANK et les facteurs TRAF

L'activation de RANK requiert sa liaison à RANKL, ce qui provoque la trimérisation du récepteur. En tant que membre de la superfamille des récepteurs TNF (TNFRSF), RANK est dépourvu d'activité kinase intrinsèque comme c'est le cas, par exemple, pour le récepteur du M-CSF, c-fms. Tout comme les autres récepteurs TNFRSF, l'activation de cascades de signalisation par RANK requiert l'une ou l'autre des protéines adaptatrices TRAF (TNF receptor-associated factor). *In vitro* et dans des cellules transfectées, TRAF 1, 2, 3, 5 et 6 peuvent se lier au domaine cytoplasmique de RANK (Galibert et al., 1998; Kim et al., 1999). Par contre, parmi tous ces TRAF, TRAF6 semble jouer un rôle critique, puisque la délétion du gène *Traf6* chez la souris réduit la différenciation et l'activation des ostéoclastes *in vivo*, causant un phénotype ostéopétrotique (Naito et al., 1999; Lomaga et al., 1999). De plus, une autre étude a montré que la région de liaison à TRAF6 sur le récepteur RANK était essentielle à l'activation de l'activité résorptive par RANKL dans les ostéoclastes (Armstrong et al., 2002). Une étude récente suggère cependant que TRAF2 serait aussi important pour l'ostéoclastogenèse (Kanazawa and Kudo, 2005). Puisque les souris déficientes en TRAF2 meurent au cours du développement, les auteurs de cette étude ont fait appel à un système *in vitro* d'ostéoclastogenèse utilisant des cellules de foie fœtal comme précurseurs d'ostéoclastes. Leurs résultats suggèrent que TRAF2 est essentiel pour l'ostéoclastogenèse induite par  $TNF\alpha$ , mais qu'il n'est pas requis pour la différenciation induite par RANKL.

Le recrutement de TRAF6 et/ou d'autres TRAF au domaine cytoplasmique de RANK est responsable en partie de l'activation de plusieurs voies de signalisation incluant  $NF\kappa B$ , les trois voies classiques des MAP kinases (MAPK), la PI3 kinase et AKT et

la relâche de calcium dans le cytoplasme (Song et al., 1997; Lee et al., 2000). Il apparaît évident, cependant, que d'autres molécules adaptatrices soient impliquées dans l'activation de ces voies par RANK. Notamment, l'ablation du gène *Gab2* chez la souris provoque un défaut dans la différenciation des ostéoclastes et dans l'activation de certaines des cascades activées par RANK (Wada et al., 2005). Cette étude démontre également que la protéine adaptatrice *Gab2* s'associe avec RANK et qu'elle pourrait donc directement participer à la transduction de signaux à partir de ce récepteur.

#### 1.2.2.2. Signalisation en aval de RANK

On distingue trois types de réponses cellulaires induites par RANKL : la différenciation en ostéoclaste, la survie cellulaire et la stimulation de la résorption. Ces effets peuvent se manifester chez les préostéoclastes (différenciation et survie) et chez les ostéoclastes matures (survie et résorption). Les réponses cellulaires au RANKL diffèrent donc selon le stade de différenciation des ostéoclastes. Ces diverses réponses au RANKL indiquent également que des voies de signalisation distinctes provoquent chacune de ces réponses (Figure 1.11). Cette section abordera en détail chacune de ces voies de signalisation, mais d'abord il m'apparaît important de définir précisément les réponses cellulaires au RANKL et quelles voies de signalisation sont responsables de chacune de ces réponses.

RANKL stimule la différenciation des préostéoclastes en ostéoclastes, ce qui se manifeste principalement par une induction de la transcription de gènes spécifiques aux ostéoclastes. Ces gènes sont impliqués pour la plupart dans la fonction de résorption des ostéoclastes matures et codent pour la phosphatase acide tartrate-résistante (*Trap*), la protéase cathepsine K (*CtsK*), le récepteur à la calcitonine (*CtR*) et les sous-unités  $\alpha_v$  et  $\beta_3$  des intégrines (*Intav* et *Intb3*) (Lacey et al., 1998). D'autres gènes induits par RANKL codent plutôt pour des facteurs de transcription, eux-

mêmes impliqués dans l'induction des gènes susmentionnés. Les gènes codant pour les facteurs de transcription c-myc, NFATc1, Fos et Fra-1 font partie de ce groupe (Battaglini et al., 2002; Takayanagi et al., 2002a; Grigoriadis et al., 1994; Matsuo et al., 2000). Les cascades de signalisation des MAPK ERK1/2, JNK1 et p38, l'activation de NFATc1 et la voie de NFκB seraient responsables de la réponse de différenciation induite par RANK.

*In vitro* RANKL favorise la survie des préostéoclastes et des ostéoclastes matures (Wong et al., 1999). Cet effet sur la survie découlerait en fait d'une activation par RANK de cascades anti-apoptotiques. Les voies de signalisation impliquant NFκB, la PI3 kinase et AKT et les MAPK ERK1/2 seraient responsables dans la réponse anti-apoptotique au RANKL.

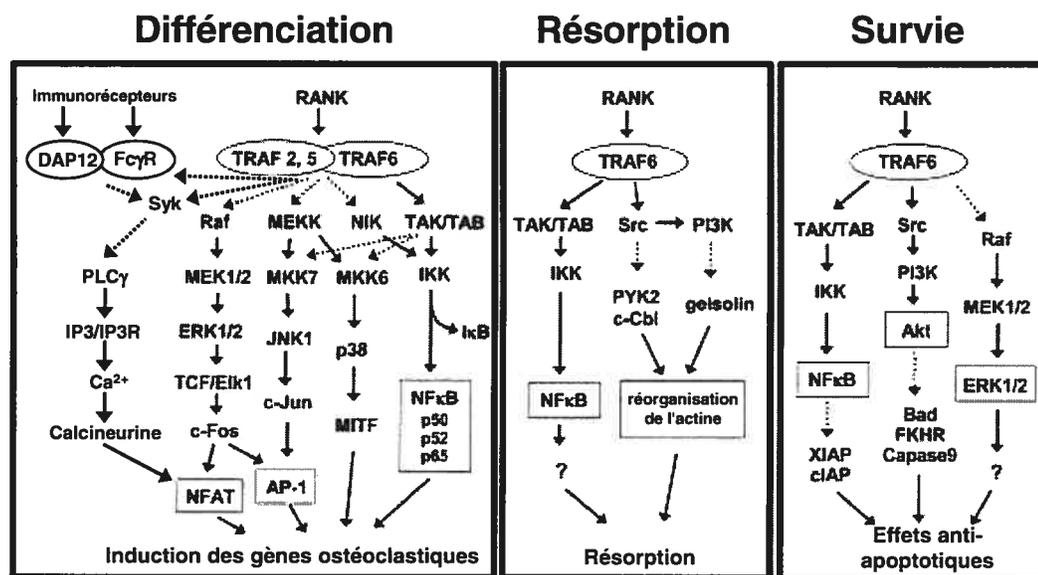


Figure 1-11. Voies de signalisation activées par RANK dans les ostéoclastes et les réponses cellulaires associées à chacune de ces voies.

(Lee and Kim, 2003)

L'effet pro-résorption de RANKL est probablement la réponse cellulaire induite par cette cytokine qui est la moins bien connue. Sur les ostéoclastes matures RANKL

stimule la réorganisation du cytosquelette d'actine, la motilité cellulaire et active la résorption (Lacey et al., 1998). On sait que la molécule adaptatrice TRAF6 est essentielle pour que RANKL puisse induire des changements dans le cytosquelette (Armstrong et al., 2002; Lomaga et al., 1999). Lomaga *et al.* ont observé que les ostéoclastes déficients en TRAF6 (*Traf6*<sup>-/-</sup>) étaient incapables de résorber la matrice osseuse et qu'ils étaient dépourvus de membrane plissée et d'anneau d'actine. L'implication de TRAF6 dans ces processus suggère que des voies de signalisation en aval de cette molécule adaptatrice sont responsables de ces effets. Les données accumulées jusqu'à présent montrent que la résorption est activée en réponse au RANKL par la PI3 kinase, AKT et NFκB.

Les prochaines sections aborderont en détails les voies de signalisation qui sont activées par RANK suite à la liaison de RANKL. Je tenterai aussi de montrer comment chacune de ces voies peut être reliée de façon moléculaire aux réponses cellulaires que je viens d'énumérer.

#### **1.2.2.2.1. NFκB**

Comme le dénote son nom, « receptor activator of NFκB », RANK est un récepteur qui possède la capacité d'activer les facteurs de transcription NFκB. Chez les mammifères il existe cinq membres de la famille « nuclear factor-κB » (NFκB) : Rel (aussi appelé cRel), RelA (aussi appelé p65), RelB, p50 (aussi appelé NFκB1) et p52 (aussi appelé NFκB2). Ces deux derniers facteurs sont produits à partir de précurseurs plus longs, p105 et p100, respectivement. Les membres de la famille NFκB doivent dimériser afin d'être transcriptionnellement actifs. Tous les homo- et hétérodimères possibles existent *in vivo*, sauf pour RelB qui ne peut interagir qu'avec p50 et p52 (Siebenlist et al., 2005).

L'activité transcriptionnelle des facteurs NF $\kappa$ B semble être cruciale pour la différenciation des ostéoclastes *in vivo* chez la souris. En effet, les souris déficientes en p50 et p52, deux protéines de la famille NF $\kappa$ B, présentent un blocage de l'ostéoclastogenèse accompagné d'un phénotype ostéopérotique sévère (Iotsova et al., 1997; Franzoso et al., 1997; Jimi et al., 1999).

Les voies d'activation de NF $\kappa$ B ont été étudiées de façon intensive et ont fait l'objet de nombreuses publications au cours des dernières années. Je me contenterai ici d'expliquer brièvement les mécanismes généraux qui contrôlent cette voie et, plus spécifiquement, comment NF $\kappa$ B est activé en aval de RANK. Dans les cellules non stimulées, les facteurs NF $\kappa$ B sont retenus dans le cytoplasme sous forme d'un complexe incluant un dimère de protéines NF $\kappa$ B et une protéine inhibitrice de NF $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  ou I $\kappa$ B $\epsilon$ ). L'interaction entre NF $\kappa$ B et I $\kappa$ B se produit via les répétitions ankyrines contenues dans I $\kappa$ B. Les stimuli qui activent NF $\kappa$ B, incluant RANKL, induisent l'activation de la kinase d'I $\kappa$ B (IKK), provoquant la phosphorylation, l'ubiquitination et la dégradation d'I $\kappa$ B par la voie du protéasome. La libération de NF $\kappa$ B permet son entrée dans le noyau, où il peut lier des sites spécifiques sur l'ADN et activer la transcription de gènes cibles. Dans les ostéoclastes et leurs précurseurs, il a été démontré que la stimulation de RANK induit la phosphorylation et la dégradation de I $\kappa$ B $\alpha$  et la translocation au noyau, puis la liaison à l'ADN des protéines NF $\kappa$ B p50, p52 et p65 (Figure 1-11) (Jimi et al., 1999; Wei et al., 2001; Abu-Amer et al., 2001).

La kinase IKK est active sous forme d'un complexe incluant deux sous-unités catalytiques, IKK $\alpha$  et IKK $\beta$ , et une sous-unité régulatrice, IKK $\gamma$  (aussi appelée NEMO). Deux études suggèrent que, parmi les deux sous-unités catalytiques, seule IKK $\beta$  est essentielle à l'activation de NF $\kappa$ B par RANK. D'abord, un dominant-négatif d'IKK $\beta$  (mutant kinase inactive) empêche la dégradation de I $\kappa$ B, la translocation au noyau et la liaison à l'ADN de NF $\kappa$ B en réponse au RANKL

(Yamamoto et al., 2002). De plus, l'ablation du gène codant pour IKK $\beta$  provoque l'ostéopérose chez la souris causée par une réduction du nombre d'ostéoclastes et un défaut dans l'activation de NF $\kappa$ B. Selon la même étude, les souris déficientes en IKK $\alpha$  présentent une ostéoclastogenèse *in vivo* et une masse osseuse normale, ce qui démontre, selon les auteurs, que seul IKK $\beta$  est requis lors de la différenciation en réponse au RANKL (Ruocco et al., 2005). Cependant, d'autres études contredisent partiellement cette conclusion en suggérant que, du moins *in vitro* dans des cultures d'ostéoclastes, IKK $\alpha$  est requise pour la différenciation. Plutôt que d'être impliquée dans la dégradation de I $\kappa$ B, comme c'est le cas pour IKK $\beta$ , IKK $\alpha$  serait importante pour la maturation du précurseur NF $\kappa$ B2 p100 en facteur mature NF $\kappa$ B p52 (Chaisson et al., 2004; Senftleben et al., 2001). Ce mécanisme est intéressant puisqu'il suggère une modulation de la voie de NF $\kappa$ B indépendante de la phosphorylation et de la dégradation de I $\kappa$ B. Finalement, la sous-unité régulatrice IKK $\gamma$ /NEMO serait également importante pour l'ostéoclastogenèse, puisque, si son interaction avec IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  est bloquée, la phosphorylation de I $\kappa$ B $\alpha$  en réponse au RANKL, l'ostéoclastogenèse et l'activité de résorption *in vivo* et *in vitro* sont considérablement réduites (Dai et al., 2004).

L'activation de la voie NF $\kappa$ B par RANK requiert la présence de facteurs TRAF fonctionnels. En effet, des mutants dominants-négatifs de TRAF2, TRAF5 et TRAF6 interfèrent avec l'activation de NF $\kappa$ B par RANK dans des cellules 293 transfectées (Galibert et al., 1998). Deux autres protéines seraient importantes dans l'activation de IKK, la MAP kinase kinase kinase TAK1 (TGF $\beta$  inducible kinase) et une molécule adaptatrice, TAB2. TAK1 et TAB2 sont recrutés dans un complexe par TRAF6 suite à l'activation de RANK et un dominant négatif de TAK1 inhibe l'activation de IKK par RANK (Kishida et al., 2005; Lee et al., 2002b; Mizukami et al., 2002).

Le phénotype des souris *p50*<sup>-/-</sup>*p52*<sup>-/-</sup> démontre qu'un certain niveau d'activation de NF $\kappa$ B est essentiel à la différenciation des ostéoclastes. Les cibles transcriptionnelles

de NFκB en aval de RANK sont donc probablement des gènes spécifiques aux ostéoclastes, mais le mécanisme précis par lequel les facteurs NFκB participent à l'ostéoclastogenèse n'est pas encore bien défini. L'activation de NFκB par RANK serait également importante pour la survie et l'activation des ostéoclastes matures (Jimi et al., 1998; Miyazaki et al., 2000). Une signalisation croisée impliquant la PI3 kinase et NFκB serait impliquée dans l'effet anti-apoptotique de NFκB (Gingery et al., 2003). Il reste cependant à définir les mécanismes moléculaires par lesquels NFκB contrôle les processus de survie et d'activation de l'ostéoclaste.

#### 1.2.2.2.2. MAP kinases : ERK, JNK et p38

L'activation des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) par RANK est relativement bien caractérisée. Les MAPK classiques qui incluent ERK, JNK et p38, sont activées de façon similaire via une cascade de sérine/thréonine kinases qui s'activent l'une après l'autre dans des événements coordonnés de phosphorylation en série. Ce type de cascade inclut normalement une MAPK kinase kinase (MAPKKK), une MAPK kinase (MAPKK) et une MAPK. Par exemple, dans le cas de la voie des ERK, la MAPKKK est Raf, la MAPK est MEK1 ou MEK2, et la MAPK est ERK1 ou ERK2 (Figure 1-11). Une fois activées les MAPK vont elles-mêmes phosphoryler des effecteurs, souvent des facteurs de transcription. La phosphorylation de ces facteurs modifie leur activité transcriptionnelle, ce qui résulte en une réponse cellulaire donnée.

Il a été démontré que les MAPK ERK, JNK et p38 sont toutes trois activées par RANK dans les ostéoclastes et leurs précurseurs (Jimi et al., 1999; Lee et al., 2002a; Wong et al., 1999; Li et al., 2002b). Ces études montrent notamment que des inhibiteurs de p38 bloquent l'ostéoclastogenèse. Des préostéoclastes dérivés de souris *Jnk1*<sup>-/-</sup>, mais pas de souris *Jnk2*<sup>-/-</sup>, montre un potentiel de différenciation réduit en réponse au RANKL, suggérant que seule JNK1 est requise pour l'ostéoclastogenèse

(David et al., 2002). Notons, cependant, que les souris *Jnk1<sup>-/-</sup>* ne présentent pas de phénotype osseux, suggérant que, *in vivo*, JNK1 n'est pas essentielle à l'homéostasie osseuse.

Des préostéoclastes dérivés de souris déficientes en TRAF6 sont incapables d'activer JNK et p38 en réponse au RANKL, suggérant que TRAF6 joue un rôle critique dans l'activation de ces MAPK par RANK (Kobayashi et al., 2001). Une étude *in vitro* sur des ostéoclastes matures montre que ERK1/2 sont plutôt activés par une voie dépendant de la PI3 kinase suite à la stimulation au RANKL (Gingery et al., 2003).

Concernant les MAPKKK et les MAPKK impliquées dans la réponse au RANKL, il existe quelques indices obtenus par des expériences *in vitro* (Figure 1-11). D'abord, MKK7 serait la MAPKK responsable de l'activation de JNK dans les ostéoclastes puisqu'un dominant-négatif de cette kinase inhibe la phosphorylation de JNK et la formation d'ostéoclastes en réponse au RANKL dans des cellules RAW 264.7 (Yamamoto et al., 2002). Des expériences similaires, faisant appel à des dominants négatifs et à des inhibiteurs pharmacologiques, ont montré que MKK6 et MEK1/2 seraient quant à elles les MAPKK de p38 et de ERK, respectivement (Matsumoto et al., 2000; Kim et al., 2003). Une forme inactive de MEKK1 bloque l'activation de JNK par TRAF2, suggérant que cette MAPKKK pourrait être impliquée dans la réponse au RANKL. Raf, la MAPKKK de la voie des ERK, a été impliquée dans l'activation des ERK en aval de CD40 (voir section 1.2.1.3), un récepteur de la famille TNFR qui partage certaines caractéristiques avec RANK (Kashiwada et al., 1998). Finalement, une autre MAPKKK, TAK1, serait aussi impliquée dans l'activation de JNK en aval de TRAF6 (Lee et al., 2002b).

Des cibles importantes en aval de ERK et de JNK dans les ostéoclastes sont les facteurs de transcription de la famille AP-1, un dimère formé de protéines de la famille des facteurs Fos (Fos, FosB, Fra1 et Fra2) et de la famille des facteurs Jun (c-jun, JunB et JunD). ERK peut induire et activer Fos, tandis que JNK peut augmenter

l'activité transcriptionnelle de AP-1 en phosphorylant c-jun (David et al., 2002; Cano et al., 1995).

Les souris déficientes en Fos sont ostéopérotiques et dépourvues d'ostéoclastes, ce qui souligne l'importance des facteurs AP-1 dans l'ostéoclastogenèse (Grigoriadis et al., 1994). Fra1 (aussi appelé Fos11), un autre membre de la famille Fos, est lui-même induit par Fos dans les préostéoclastes (Matsuo et al., 2000). La surexpression de Fra1 ou la substitution du gène *Fos* par le gène *Fosl1* suffit à corriger le phénotype des souris *Fos*<sup>-/-</sup> indiquant qu'il s'agit d'une cible transcriptionnelle importante de Fos dans l'ostéoclastogenèse (Fleischmann et al., 2000).

Deux facteurs de la famille Jun, c-jun et JunB, ont été impliqués dans la réponse au RANKL. L'ablation des gènes *Jun* ou *JunB* est létale très tôt dans le développement chez la souris, ce qui empêche l'étude de la fonction de ces gènes dans l'ostéoclastogenèse. Afin de contourner ce problème une approche d'ablation génique conditionnelle pour *JunB* et une approche par transgénèse pour *Jun* ont été employées par deux groupes. L'ablation conditionnelle de JunB dans les ostéoclastes chez la souris cause un phénotype ostéopérotique et un défaut dans la différenciation qui se manifeste par une réduction dans l'expression de gènes spécifiques aux ostéoclastes comme *Trap* et *CalI* (anhydrase carbonique II) (Kenner et al., 2004). Notons que les ostéoblastes *JunB*<sup>-/-</sup> présente également un défaut de différenciation (voir section 1.1.2.1). Afin de démontrer l'importance de c-jun, un autre groupe a surexprimé de façon ciblée, grâce au promoteur TRAP, un mutant de c-jun sans son domaine d'activation de la transcription (dominant négatif) dans les ostéoclastes. Les souris transgéniques TRAP-DN-c-jun sont pratiquement dépourvues d'ostéoclastes et développent une ostéopérose sévère (Ikeda et al., 2004). Les travaux de ces chercheurs montrent également que c-jun, activé par JNK1 et de concert avec Fos, active la transcription du gène codant pour le facteur de transcription NFATc2 (NFAT1). NFATc2 serait lui-même responsable de la transcription du gène codant

pour NFATc1 (NFAT2) un facteur essentiel à la différenciation des ostéoclastes (voir section 1.2.2.2.3.).

Le facteur de transcription Mitf à domaine bHLH-ZIP (basique-hélice-boucle-hélice-zipper de leucines) est phosphorylé par p38, en sérine 245, et par ERK, en sérine 73 (Weilbaecher et al., 2001; Mansky et al., 2002). Ces modifications affectent de façon positive l'activité transcriptionnelle de Mitf. La phosphorylation par p38 dépend d'une stimulation par RANKL, alors que la phosphorylation par ERK est activée par le M-CSF. Mitf et un autre membre de la famille bHLH-ZIP, Tfe3, sont deux facteurs essentiels à la transcription de gènes spécifiques aux ostéoclastes comme *Trap* et *Ctsk* (Luchin et al., 2000; Motyckova et al., 2001). Les souris homozygotes pour un allèle semidominant de Mitf (*Mitf<sup>mi</sup>/Mitf<sup>mi</sup>*) et les souris doubles mutantes *Mitf<sup>-/-</sup>Tfe<sup>-/-</sup>* développent un phénotype ostéopétritique (Hodgkinson et al., 1993; Steingrimsson et al., 2002).

Nous avons vu qu'il existe de nombreuses preuves *in vitro* de l'implication des MAPK dans la différenciation des ostéoclastes. Malheureusement pour l'instant, aucune étude génétique n'est venue appuyer ces résultats, particulièrement en ce qui concerne les voies p38 et ERK. Il existe une redondance certaine dans chacune des familles de MAPK : ERK1 et 2, JNK1, 2 et 3, et p38 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  et  $\gamma$ . Jusqu'à présent, cette redondance est en grande partie responsable de l'absence de preuves génétiques du rôle joué par les différentes MAPK dans l'ostéoclastogenèse. De plus, l'ablation de certains de ces gènes provoque des phénotypes de mort embryonnaire très précoce, empêchant l'étude de l'ostéoclastogenèse. L'étude de doubles ou triples mutants dans des systèmes d'ablation génique conditionnelle permettrait sans doute d'obtenir quelques réponses concernant le rôle des MAPK, des MAPKK et des MAPKKK dans l'ostéoclastogenèse *in vivo*.

### 1.2.2.2.3. Le calcium, la calcineurine et les facteurs de transcription de la famille NFAT

*NFATc1* (*NFAT2*), un membre de la famille des gènes NFAT (Rao et al., 1997), a récemment été identifié comme le facteur de transcription le plus fortement induit dans les préostéoclastes en réponse au RANKL (Takayanagi et al., 2002a). Plusieurs expériences ont par la suite démontrés le rôle essentiel joué par *NFATc1* dans l'ostéoclastogenèse. D'abord, les précurseurs hématopoïétiques *NFATc1*<sup>-/-</sup> ne peuvent se différencier en ostéoclastes en présence de RANKL. Ensuite, l'expression ectopique de *NFATc1* dans des monocytes cause la différenciation spontanée de ces cellules en ostéoclastes en absence de RANKL (Takayanagi et al., 2002a; Matsuo et al., 2004). RANKL active *NAFTc1* de deux façons : indirectement, au niveau transcriptionnel, et, directement, par la voie du calcium.

Au niveau transcriptionnel, l'induction de *NFATc1* par RANKL dépend de Fos et de TRAF6 (Takayanagi et al., 2002a; Gohda et al., 2005). Il est clair que *NFATc1* est une cible transcriptionnelle de Fos, car la surexpression d'une forme constitutivement active de NFAT peut corriger le défaut de différenciation des ostéoclastes *Fos*<sup>-/-</sup> (Matsuo et al., 2004). Une étude suggère que les facteurs *NFATc2* (*NFAT1*) et c-jun seraient aussi requis pour la transcription de *NFATc1* (Ikeda et al., 2004). L'importance de l'activité des facteurs AP-1 ne se limite pas à la transcription de *NFATc1* au stade précoce de l'ostéoclastogenèse. En effet, aux stades plus tardifs de différenciation, *NFATc1* coopère avec Fos et c-jun afin de participer à la transcription des gènes *TRAP* et *CtR* (Takayanagi et al., 2002a; Matsuo et al., 2004). Les gènes codant pour la cathepsine K et la métalloprotéinase MMP9 seraient aussi des cibles de *NFATc1* et d'AP-1 (Matsumoto et al., 2004; Munaut et al., 1999).

J'ai déjà expliqué comment *NFATc1* était activé par certains immunorécepteurs couplés à des protéines à domaine ITAM par une voie impliquant la PLC $\gamma$ , l'oscillation du calcium intracellulaire et l'activation de la calcineurine (voir section

1.2.1.3.). Plusieurs résultats expérimentaux suggèrent que RANK, suite à la liaison de RANKL, puisse également activer une voie de signalisation similaire qui résulte en la translocation de NFATc1 au noyau. La stimulation d'ostéoclastes matures avec RANKL provoque l'augmentation du calcium cytoplasmique (Komarova et al., 2003). Cette augmentation du calcium est dépendante de la PLC $\gamma$ , puisqu'elle est bloquée par des inhibiteurs de cette enzyme. Des inhibiteurs de la calcineurine comme FK506 et cyclosporine A inhibent fortement l'ostéoclastogenèse et la translocation nucléaire de NFATc1. De plus, l'inhibition de l'activité de NFATc1 par FK506 résulte en un défaut de l'induction de l'ARN messager (ARNm) de *NFATc1*, indiquant que la transcription de ce gène dépend de l'activité de NFATc1 lui-même. NFATc1 autoamplifierait sa propre transcription possiblement en liant son propre promoteur (Takayanagi et al., 2002a). J'ai déjà mentionné qu'une étude suggère que cette transcription pourrait aussi dépendre d'un autre facteur de la famille NFAT, NFATc2 (Ikeda et al., 2004).

Le rôle des facteurs NFAT et de la voie du calcium dans l'ostéoclastogenèse *in vivo* reste à être démontré. Les souris déficientes en NFATc2 sont viables, mais aucune étude n'a investigué la présence éventuelle d'un phénotype osseux chez celles-ci (Viola et al., 1998; Xanthoudakis et al., 1996). Étant donné le rôle essentiel de NFATc2 dans la transcription de NFATc1 proposé par Ikeda *et al.*, on devrait s'attendre à un phénotype ostéopétrotique chez ces souris. L'ablation du gène *NFATc1* est létale entre les jours embryonnaires 13,5 et 17,5 chez la souris, ne permettant pas l'étude du rôle de ce gène dans l'homéostasie osseuse (de la Pompa et al., 1998; Ranger et al., 1998). Une fois encore, l'utilisation d'un système d'ablation génique conditionnelle permettrait de vérifier le rôle de NFATc1 dans l'ostéoclastogenèse *in vivo*. La PLC $\gamma$ 2 est l'isoforme prédominante de la PLC $\gamma$  dans les monocytes et les macrophages. L'inactivation du gène *PLC $\gamma$ 2* affecte la voie du calcium dans les macrophages, il serait donc important de vérifier la présence d'un défaut d'ostéoclastogenèse dans les souris *PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup>* (Wen et al., 2002). Concernant les récepteurs à IP3 (IP3R), il existe trois gènes chez les mammifères, *IP3R1*, *IP3R2* et

*IP3R3*, et aucune étude n'est disponible présentement sur leur fonction respective dans les ostéoclastes. Finalement, il existe trois gènes codant pour des sous-unités catalytiques de la calcineurine, *CnA $\alpha$* , *CnA $\beta$*  et *CnA $\gamma$* , l'ablation de l'un ou l'autre de ces gènes ne semble pas causer de phénotype osseux marqué (Chan et al., 2002; Bueno et al., 2002).

#### 1.2.2.2.4. La voie PI3 kinase/AKT

La sérine/thréonine kinase AKT est un médiateur important de la fonction anti-apoptotique de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) dans de multiples types cellulaires (Datta et al., 1999). AKT agit notamment en phosphorylant et en inactivant des protéines qui ont normalement un effet pro-apoptotique comme la protéine Bad, la caspase 9 et certains facteurs de transcription de la famille « forkhead related » (FKHR). AKT a aussi un rôle important à jouer dans le contrôle de la taille des cellules, via l'activation de la protéine « mammalian target of rapamycin » (mTOR) (Mak and Yeung, 2004).

Dans les ostéoclastes, RANK induit l'activation de AKT qui se manifeste par la phosphorylation de cette kinase sur les résidus sérine 473 et thréonine 308 (Wong et al., 1999; Lee et al., 2002a). L'inhibiteur de la PI3K, LY294002, bloque l'activation d'AKT et la survie des ostéoclastes matures. Cet inhibiteur a aussi un effet négatif marqué sur la différenciation de ces cellules qui pourrait découler d'une survie réduite des cellules durant la différenciation. Il n'existe pas de preuve directe de l'activation de la PI3K par RANK, mais il a été montré que, dans les ostéoclastes, l'activation d'AKT par RANK était bloquée par des inhibiteurs des Src kinases ou par l'ablation du gène *c-src* (Wong et al., 1999). Il semblerait donc que *c-src* jouerait le rôle de médiateur entre RANK et la voie PI3K/AKT.

Il reste à démontrer clairement le rôle joué par AKT dans les ostéoclastes. En effet, des études contradictoires suggèrent soit une fonction anti-apoptotique, soit une fonction dans la différenciation, soit une fonction dans l'organisation du cytosquelette. Par exemple, les travaux de Sugatani *et al.* montrent que l'inhibition de AKT à l'aide d'ARN interférent (ARNi) bloque la différenciation des ostéoclastes en affectant principalement l'activation de la voie NFκB (Sugatani and Hruska, 2005). De façon surprenante, cette étude montre aussi que la perte d'AKT n'affecte pas le clivage de la caspase 3 et n'induit pas l'apoptose. Par contre, l'inhibition à l'aide d'ARNi de la protéine mTOR, un autre effecteur de la PI3K, résulte en une activation du clivage de la caspase 3 et de l'apoptose. Ces résultats, combinés à ceux d'autres études, suggèrent donc que mTOR serait le médiateur de l'effet anti-apoptotique de la PI3K, tandis que AKT serait un médiateur de la différenciation via la voie de NFκB (Glantschnig et al., 2003; Sugatani et al., 2003; Shui et al., 2002).

La PI3K serait aussi impliquée dans la réorganisation du cytosquelette d'actine de l'ostéoclaste de façon AKT indépendante. Ce rôle, mal caractérisé, impliquerait le recrutement de la protéine gelsoline par des produits de la PI3K, le phosphatidylinositol 3,4-biphosphate (PI(3,4)P<sub>2</sub>) et le phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>). Ce recrutement empêcherait la gelsoline de lier les extrémités des filaments d'actine, permettant ainsi une réorganisation du cytosquelette (Chellaiyah et al., 1998). Les différents rôles de la PI3K et des phosphoinositides dans la différenciation et l'activation de l'ostéoclaste seront abordés plus en détails dans la section 1.3.5.

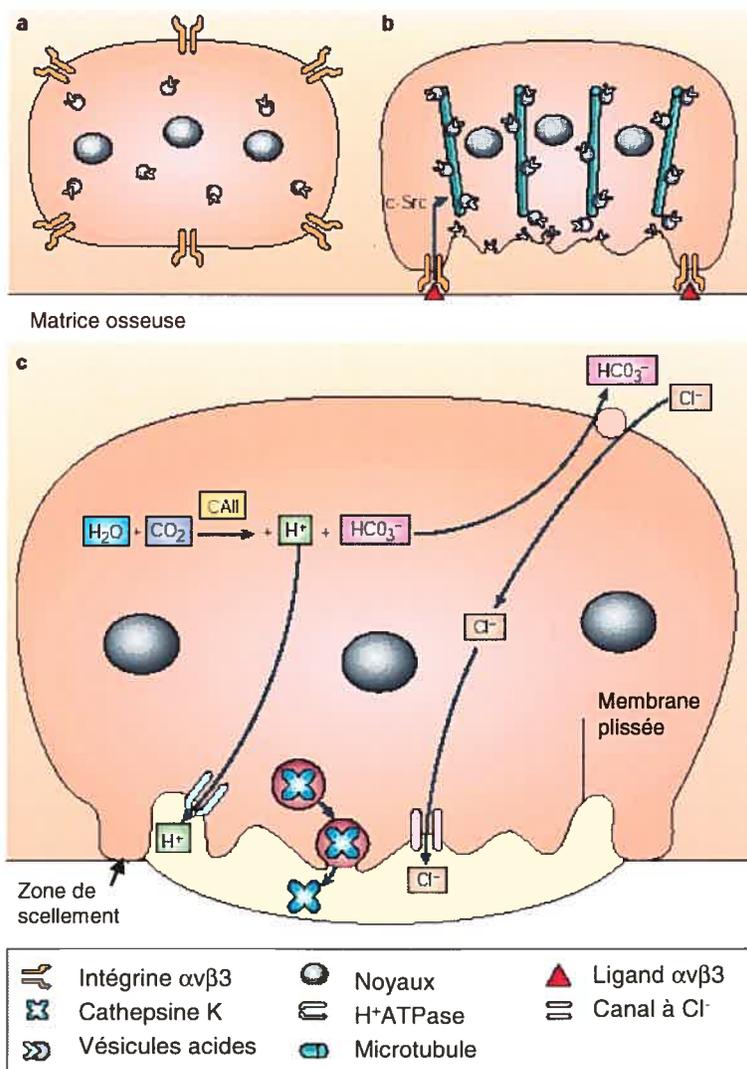
Comme c'est le cas pour les MAPK, il existe peu d'indices génétiques de l'implication de la voie PI3K/AKT dans la survie et l'activité des ostéoclastes. D'une part, il existe de nombreux gènes codant pour des sous-unités catalytiques et régulatrices de PI3K et peu d'information est disponible concernant l'expression et la fonction de chacune de ces protéines dans les ostéoclastes (voir section 1.3.2. pour les différentes classes de PI3K). Jusqu'à présent, aucun phénotype osseux n'a été

identifié dans l'une ou l'autre des expériences d'ablation génique de PI3K. D'autre part, trois gènes codent pour des kinases AKT chez les mammifères, *Akt1*, *Akt2* et *Akt3*. Les souris doubles mutantes *Akt1<sup>-/-</sup>Akt2<sup>-/-</sup>* présentent un phénotype osseux, mais il semblerait que se soit plutôt un défaut d'ossification lié à une différenciation réduite des ostéoblastes (Peng et al., 2003). Comme ces souris meurent juste après la naissance, il serait intéressant de dériver des préostéoclastes à partir de splénocytes *Akt1<sup>-/-</sup>Akt2<sup>-/-</sup>* afin de déterminer le potentiel d'ostéoclastogenèse de ces cellules en réponse au RANKL.

Nous avons vu dans cette section que la différenciation des ostéoclastes requiert plusieurs signaux paracrines. De plus, l'ostéoclastogenèse, telle qu'induite par RANKL, dépend de multiples signaux intracellulaires. Une fois différencié, l'ostéoclaste mature doit s'attacher à la matrice osseuse et la résorber. La prochaine section portera sur ces processus que l'on désigne normalement sous le terme d'activation de l'ostéoclaste.

### **1.2.3. Activation de l'ostéoclaste et résorption**

Nous avons vu, tout au long de la section précédente, que l'étude de mutants ostéopérotiques chez la souris a permis l'identification de nombreux gènes impliqués dans l'ostéoclastogenèse. La même approche a mené à l'identification d'une série de gènes impliqués dans l'activité de résorption de l'ostéoclaste. Cette classe de mutants ostéopérotiques se caractérise par la présence dans le tissu osseux d'ostéoclastes en nombre habituellement constant *in vivo*. Ces ostéoclastes sont par contre incapables de résorber la matrice osseuse. On peut subdiviser les défauts fonctionnels de l'ostéoclaste en deux catégories : 1) les défauts d'attachement à la matrice et de polarisation, et 2) les défauts liés à l'activité de résorption en soit (Figure 1-12).



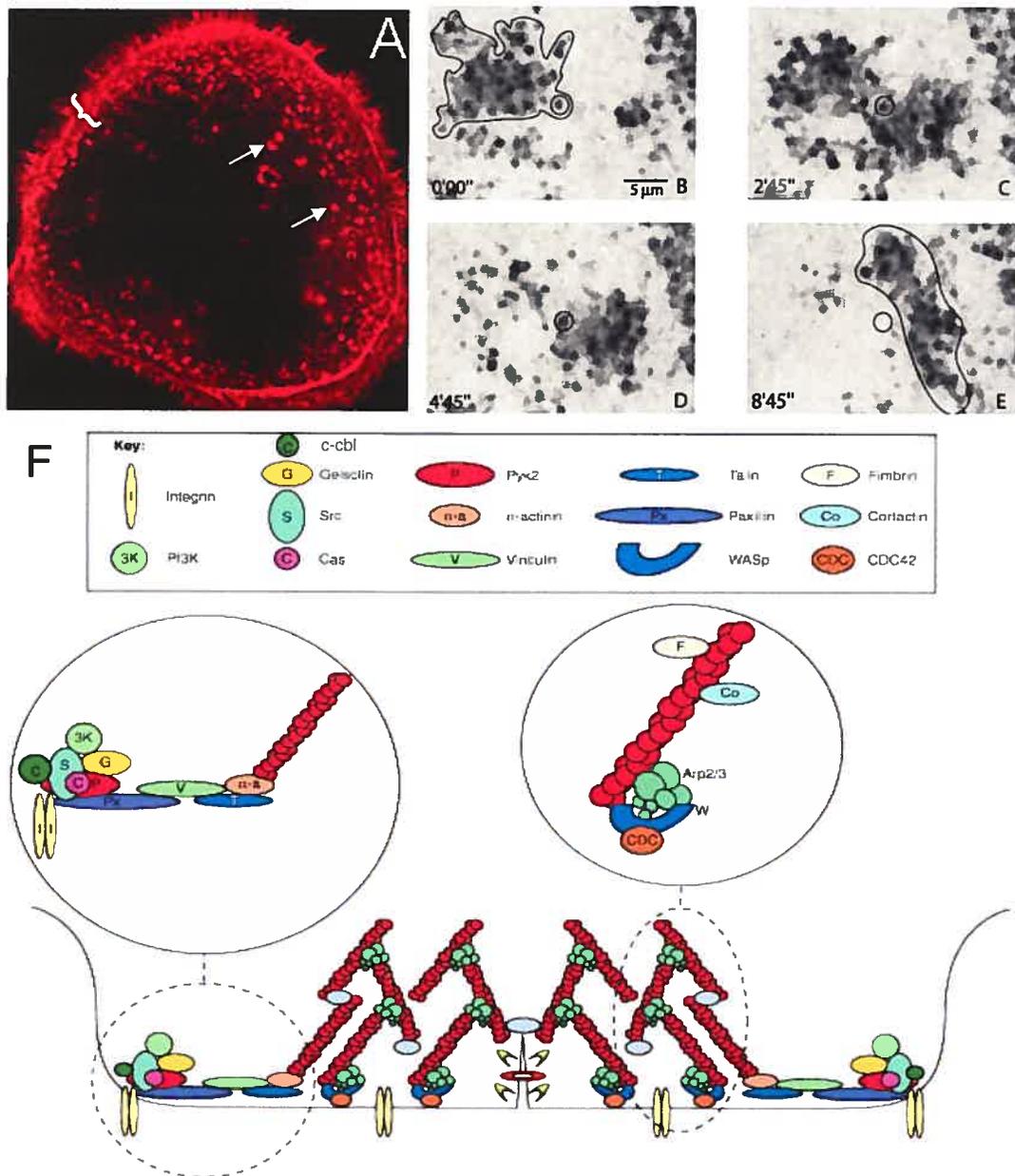
**Figure 1-12. Activation de l'ostéoclaste.**

**a)** L'ostéoclast non attaché à la matrice n'est pas polarisé. Les vésicules contenant la pompe à proton ( $\text{H}^+\text{ATPase}$ ) sont distribuées aléatoirement dans le cytoplasme. **b)** Lorsque l'ostéoclast s'attache à l'os, les intégrines sont relocalisées du côté de la matrice et transmettent un signal polarisant impliquant c-src. Les vésicules contenant la pompe à proton se déplacent alors le long des microtubules en direction de la matrice. La fusion de ces multiples vésicules mène à la formation de la membrane plissée. **c)** La résorption est démarrée par la formation de la zone de scellement riche en actine qui isole le microenvironnement de résorption du reste de l'espace extracellulaire. Les protons ( $\text{H}^+$ ) produits par l'anhydrase carbonique (CAII) sont expulsés dans la cavité de résorption par la pompe à proton, faisant chuter le pH extracellulaire à  $-4.5$ . Le pH intracellulaire est maintenu constant par l'échange de l'ion carbonate pour un ion chlorure. Les ions chlorures sont ensuite expulsés dans la cavité de résorption par un canal à chlore. La cathepsine K, une protéinase est activement sécrétée et dégrade la matrice organique (Teitelbaum and Ross, 2003).

### 1.2.3.1. Polarisation, podosomes et anneaux d'actine

La dégradation de la matrice osseuse par l'ostéoclaste requiert un contact physique étroit entre cette cellule et la matrice. Suite à cet attachement, l'ostéoclaste réorganise son cytosquelette d'actine afin de former un anneau d'actine et la zone scellée, se polarise et développe la membrane plissée nécessaire à la résorption. Les molécules par lesquelles l'ostéoclaste reconnaît et s'attache à son substrat sont donc essentielles afin d'initier la résorption.

Il est maintenant clair que l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  (aussi appelée récepteur à la vitronectine) joue un rôle central dans la reconnaissance de l'os par l'ostéoclaste. L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  reconnaît des protéines de la matrice osseuse qui contiennent le motif Arg-Gly-Asp (RGD) dans leur séquence peptidique. Les souris déficientes en la sous-unité  $\beta_3$  présentent une dysfonction dans l'activité de résorption des ostéoclastes et deviennent progressivement ostéopérotiques (McHugh et al., 2000). D'ailleurs, de petites molécules inhibitrices ciblant spécifiquement l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  sont capables de bloquer la résorption *in vitro* et de prévenir la perte osseuse *in vivo* (Engleman et al., 1997). Dans les ostéoclastes adhérents à l'os, l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est associée à l'actine filamenteuse (F-actine) dans des structures ponctuées appelées podosomes (Aubin, 1992; Linder and Aepfelbacher, 2003). Les podosomes sont des structures uniques qui partagent des caractéristiques avec les adhésions focales retrouvées dans d'autres types cellulaires (voir figure 1-13). Dans l'ostéoclaste adhérent, l'ensemble des podosomes s'organise en un anneau d'actine à la périphérie de la cellule (Destaing et al., 2003). Les ostéoclastes déficients en intégrine  $\alpha_v\beta_3$  s'attachent tout de même à l'os, mais sont incapables de réorganiser leur cytosquelette d'actine afin de former la zone scellée et présente une membrane plissée anormale (McHugh et al., 2000). Il semble donc que le rôle principal de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  soit de transmettre un signal de la matrice vers l'intérieur de la cellule. Ce signal ferait intervenir notamment les petites GTPase Rho et Rac, puisque l'activation de ces dernières est déficiente dans les ostéoclastes  $\beta_3^{-/-}$  (Faccio et al., 2003). Le Rho-GEF Vav3 qui peut



**Figure 1-13. Structure des podosomes et de l'anneau d'actine.**

**A :** Ostéoclaste coloré à la phalloïdine-rhodamine, permettant de visualiser la F-actine. Deux podosomes sont indiqués par des flèches. L'anneau d'actine, formé de multiples podosomes en périphérie de la cellule est indiqué par une accolade. **B-E :** Dynamisme des podosomes dans des ostéoclastes exprimant une protéine de fusion actine-GFP. Le même champs a été photographié aux temps indiqués. Un podosome individuel et un groupe de podosomes sont encerclés. **F :** Composants moléculaires des podosomes. L'actine est représentée par des fibres rouges, les autres protéines impliquées sont représentées dans la légende en haut. (Biswas et al., 2004; Destaing et al., 2003; Linder and Aepfelbacher, 2003).

échanger le GDP pour du GTP et activer les GTPase de la famille Rho, est essentiel à la formation de l'anneau d'actine et à la résorption (Faccio et al., 2005). Une autre étude *in vitro* implique Cdc42, une autre GTPase de la famille Rho, et Rac dans la formation des podosomes et de l'anneau d'actine (Chellaiah, 2005).

Les kinases c-src et Pyk2 (proline-rich tyrosine kinase 2) sont également impliquées dans la signalisation en aval de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  et dans la formation des podosomes (Sanjay et al., 2001; Pfaff and Jurdic, 2001). L'inhibition de Pyk2 diminue la fonction des ostéoclastes *in vitro* (Duong et al., 2001). L'assemblage du complexe activé par l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  liée à la matrice serait démarré par l'autophosphorylation de Pyk2 qui mène à l'activation et au recrutement de c-src qui peut également phosphoryler Pyk2 (Yokouchi et al., 2001; Duong et al., 1998). Une fois activé, c-src se lie à c-Cbl et le phosphoryle (Miyazaki et al., 2004). c-cbl est une ubiquitine ligase E3 également impliquée dans le recrutement de l'ostéoclaste (Lee et al., 1999; Wang et al., 1999). c-cbl provoque la polyubiquitination de c-src et de lui-même, et provoque probablement ainsi la dégradation du complexe Pyk2/c-src/c-cbl par le protéasome (Yokouchi et al., 2001). La formation, puis la dégradation de cet hétérotrimère sont sans doute très importantes afin de contrôler l'assemblage et le désassemblage des podosomes, permettant à l'ostéoclaste de migrer afin de résorber d'autres sites.

L'importance de ce complexe *in vivo* est confirmée par quelques études génétiques. Les ostéoclastes déficients en c-src sont incapables de former un anneau d'actine et une membrane plissée, causant l'ostéopétrose *in vivo* (Soriano et al., 1991; Boyce et al., 1992; Schwartzberg et al., 1997). Notons que la phosphorylation et l'activité de Pyk2 sont réduites dans les ostéoclastes *c-src*<sup>-/-</sup>. Les souris déficientes en c-Cbl présentent un léger défaut osseux relié à un problème dans la migration et l'activité de résorption des ostéoclastes (Chiusaroli et al., 2003). Aucun phénotype osseux n'a été décrit chez les souris *Pyk2*<sup>-/-</sup>. Cependant les macrophages de ces souris présentent plusieurs défauts au niveau de leur cytosquelette d'actine et de leur capacité à migrer,

laissant croire que ces fonctions pourraient être également affectées dans les ostéoclastes *Pyk2<sup>-/-</sup>* (Okigaki et al., 2003).

### 1.2.3.2. Membrane plissée et résorption

Une fois attaché à l'os, l'ostéoclaste développe la membrane plissée à l'interface entre la cellule et la matrice. Cette structure est essentielle à la résorption puisque c'est au niveau de celle-ci que se trouve la machinerie moléculaire qui permet l'acidification de la cavité de résorption. Cette acidification (pH~4.5) permet de mobiliser les minéraux de l'os, exposant ainsi la matrice organique. C'est aussi au niveau de la membrane plissée que sont sécrétées les enzymes qui dégradent la matrice organique de l'os (Figure 1-12).

La production de protons est initiée dans le cytoplasme par l'anhydrase carbonique II (CAII) qui catalyse la réaction suivante :



Les protons ainsi produits sont transportés de façon active du côté extracellulaire de la membrane plissée par une pompe à proton ( $\text{H}^+$  ATPase) (Mattsson et al., 1994). Les ions bicarbonate sont quant à eux échangés contre des ions chlorure de l'autre côté de la cellule, à la membrane basolatérale de l'ostéoclaste, permettant de maintenir un pH intracellulaire constant. L'électroneutralité du cytoplasme est maintenu grâce à un canal à chlore situé à la membrane plissée.

Il est intéressant de constater que jusqu'à présent, toutes les mutations identifiées comme causant l'ostéopétrose récessive chez l'humain se retrouvent dans des gènes impliqués dans la formation de la bordure plissée, dans l'acidification ou dans

l'activité de résorption des ostéoclastes. Ces gènes sont *CAII*, *TCIRG1*, *CLCN*, *OSTM1* et *CTSK*.

Des familles présentant un défaut dans l'expression de *CAII* développent une ostéopétrose récessive bénigne, accompagnée d'acidose tubulaire rénale et de calcification cérébrale (Sly et al., 1983).

Des mutations dans le gène *TCIRG1* qui code pour la sous-unité transmembranaire  $\alpha 3$  de 116 kDa de la pompe à proton sont responsables de près de 60% des cas humains d'ostéopétrose récessive (Kornak et al., 2000; Michigami et al., 2002). Chez la souris, le mutant *oc/oc* ostéopétrotique, présente aussi une mutation dans le gène *Tcirg1* (Scimeca et al., 2000; Li et al., 1999). Ces souris, tout comme les patients ayant des mutations dans *TCIRG1*, présentent un transport des protons normal dans toutes les cellules, sauf dans les ostéoclastes, suggérant que la sous-unité  $\alpha 3$  joue un rôle unique dans les ostéoclastes. Ce rôle pourrait être de permettre la localisation de la pompe à proton à la membrane plissée, un processus dépendant de c-src. En effet, la pompe à proton est transportée jusqu'à la membrane plissée dans des vésicules auxquelles est associé c-src (Abu-Amer et al., 1997). Des mutations dans *c-src* chez la souris ou dans *TCIRG1*, chez l'humain, empêchent la formation de la membrane plissée, indiquant le rôle important jouée par la sous-unité  $\alpha 3$  de la pompe à proton et c-src dans la formation de cette structure (Boyce et al., 1992) (Michigami et al., 2002).

Puisque la résorption de l'os requiert un transport massif de protons vers le compartiment extracellulaire, un transport parallèle d'anions est requis afin de maintenir l'électroneutralité dans l'ostéoclaste. Cette fonction est assurée par le canal de chlore *ClC-7*. L'ablation du gène *Clcn7* chez la souris cause l'ostéopétrose due à une absence d'acidification par les ostéoclastes (Kornak et al., 2001). Des mutations dans le gène *CLCN7* chez l'humain sont responsables de forme récessives (~15%) et dominantes d'ostéopétrose (Kornak et al., 2001; Waguespack et al., 2003).

Un quatrième gène est impliqué dans les formes humaines d'ostéopétrose récessive : *OSTMI*. *Ostm1* est le gène muté chez la souris grey-lethal (*gl*) et code pour une protéine transmembranaire de type 1 exprimée notamment dans les ostéoclastes (Chalhoub et al., 2003). Jusqu'à présent au moins trois mutations différentes reliées à des cas d'ostéopétrose récessive très sévères ont été identifiées dans le gène *OSTMI* (Chalhoub et al., 2003; Ramirez et al., 2004)(Pata *et al.* résultats non publiés). Les ostéoclastes provenant de souris *gl/gl* et ceux présents *in vivo* chez les patients présentant des mutations dans *OSTMI* se différencient, mais sont dépourvus de membrane plissée (Rajapurohitam et al., 2001; Quarello et al., 2004). La fonction cellulaire d'*Ostm1* reste à découvrir, mais ces résultats suggèrent une implication dans la formation de la membrane plissée et dans la résorption. J'aborderai plus en détails le phénotype de la souris *gl* et le gène *Ostm1* dans la section 1.4.

L'acidification du microenvironnement de la cavité de résorption permet de mobiliser la matrice minérale afin d'exposer la matrice organique. Étant donné cet environnement très acide, la dégradation de la matrice organique requiert des enzymes collagénolytiques ayant un pH optimum bas. On a identifié l'une de ces enzymes comme étant la protéinase cathepsine K, lorsqu'il a été démontré que des mutations dans le gène *CTSK* étaient responsables de la pycnodysostose, un désordre sclérosant de l'os (Gelb et al., 1996). Les ostéoclastes des patients atteints de pycnodysostose, tout comme les ostéoclastes des souris *Ctsk*<sup>-/-</sup>, développent une membrane plissée normale et mobilisent les minéraux, mais sont incapables de dégrader la matrice organique de collagène (Saftig et al., 1998).

Le messager de la cathepsine K est exprimé fortement dans les ostéoclastes comparativement aux autres tissus, suggérant une régulation transcriptionnelle de ce gène par des facteurs spécifiques aux ostéoclastes (Gelb et al., 1996). Une étude récente montre en effet que l'expression de *Ctsk* dans les ostéoclastes est activée de façon synergique par les facteurs de transcription NFATc1, PU.1 et microphthalmia (*Mitf*) qui lient la région promotrice de ce gène. De plus, l'activité de la MAPK p38

est nécessaire afin d'observer une expression maximal de la cathepsine K dans les cellules RAW 264.7 (Matsumoto et al., 2004).

La cathepsine K est synthétisée sous une forme inactive (zymogène) et est activée par un clivage protéolytique au cours du processus de sécrétion entre l'appareil de Golgi et la membrane plissée. Les ostéoclastes attachés à l'os expriment uniquement la forme active de l'enzyme, indiquant qu'un signal dérivé de la matrice pourrait induire la maturation intracellulaire de la cathepsine K (Dodds et al., 2001). La cathepsine K est considérée comme une cible thérapeutique intéressante afin de réduire l'activité de résorption des ostéoclastes chez les patients ostéoporotiques (Lark et al., 2002).

Nous venons de voir que l'activité de résorption de l'ostéoclaste implique la fonctionnalité de deux structures cellulaires : l'anneau d'actine et la membrane plissée. Le rôle clef de ces deux structures reflète en fait l'importance majeure des réarrangements du cytosquelette associés à la motilité et à la résorption dans la fonction normale de l'ostéoclaste. De nombreuses protéines ont été impliquées dans le contrôle de ces processus, mais il reste beaucoup à faire afin de comprendre ces mécanismes au niveau moléculaire. D'autant plus que, comme je l'ai mentionné pour l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  et la cathepsine K, les protéines impliquées dans ces activités constituent des cibles de choix afin de développer des inhibiteurs de la résorption.

Cette deuxième partie nous a permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui contrôlent la différenciation et l'activité des ostéoclastes. Nous avons vu que de nombreuses voies de signalisation sont impliquées dans le contrôle de ces processus, notamment en aval du récepteur RANK. Parmi ces cascades de signalisation, certaines impliquent la production ou la modification de seconds messagers. La prochaine partie de cette introduction portera sur la synthèse et la fonction d'une classe importante de seconds messagers, les phosphoinositides et les phosphatidylinositols.

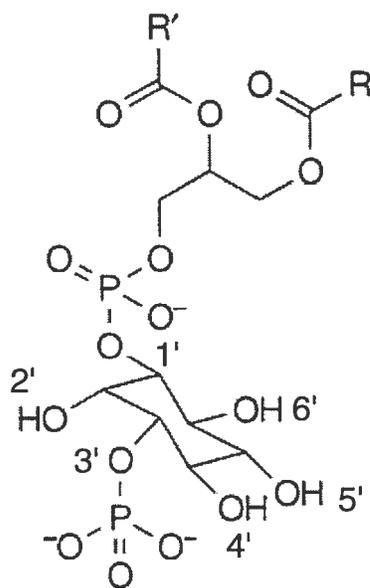
### 1.3. SIGNALISATION PAR LES PHOSPHOINOSITIDES

Afin d'intégrer et de transmettre de la membrane vers le cytoplasme et le noyau l'information reçue de l'extérieure, la cellule eucaryote fait appel à différents mécanismes moléculaires, généralement regroupés sous le terme de signalisation intracellulaire. Pour modifier l'équilibre cellulaire, ces mécanismes mettent en scène une pléiade de protéines et de réactions catalytiques : phosphorylation, déphosphorylation, ubiquitination, hydrolyse, sumoilation, etc. L'une des approches redondantes qu'a adopté la cellule afin d'enclencher des cascades signalitiques est la production de seconds messagers. Ces derniers sont de petites molécules non peptidiques produites de façon locale et momentanée. Parmi celles-ci on retrouve l'adénosine monophosphate cyclique (cAMP), le guanosine monophosphate cyclique (cGMP), le diacylglycérol et les multiples dérivés du phosphatidylinositol. Cette partie de mon introduction portera sur la synthèse et les fonctions des différents phosphoinositides. J'aborderai leur mode d'action et le contrôle de leur concentration respective dans la cellule par certaines inositol phosphatases. Une attention particulière sera accordée à une classe de ces phosphatases, les inositol polyphosphate 4-phosphatases, sujet important de cette thèse. Finalement, nous verrons les diverses fonctions jouées par les phosphoinositides dans les ostéoclastes et le maintien de l'homéostasie osseuse.

#### 1.3.1. Voie de synthèse générale des différents phosphoinositides et distribution cellulaire des divers phosphatidylinositol phosphates

Les phosphoinositides sont les dérivés phosphorylés du phosphatidylinositol (PI), un phospholipide membranaire (Figure 1-14 et 1-16). Les PIs se retrouvent dans le feuillet cytoplasmique de la membrane plasmique, de l'appareil de Golgi, des endosomes, des phagosomes, des vésicules synaptiques, du réticulum endoplasmique et des granules de sécrétion. Ces lipides sont relativement peu abondants et

représentent moins de 10% du total des lipides dans la cellule. Ils n'en demeurent pas moins une composante clef de la membrane par la propriété unique qu'à le groupement inositol de pouvoir être phosphorylé en position 3', 4' ou 5' pour un total de une, deux ou trois fois. Ainsi, il existe *in vivo* huit différents isoformes de PIs : la forme non phosphorylée le PI, trois phosphatidylinositol phosphates (PI3P, PI4P et PI5P), trois phosphatidylinositol biphosphates (PI3,4P<sub>2</sub>, PI3,5P<sub>2</sub>, PI4,5P<sub>2</sub>) et un phosphatidylinositol triphosphate (PI3,4,5P<sub>3</sub>) (voir Figure 1-14 et 1-16). Une batterie de kinases et de phosphatases sont responsables de la synthèse et de la dégradation de ces différents isoformes, ce qui fait de la voie des PIs l'une des plus complexes et des plus versatiles de la cellule.



**Figure 1-14. Structure chimique d'un dérivé phosphorylé du phosphatidylinositol, le phosphatidylinositol 3-phosphate.**

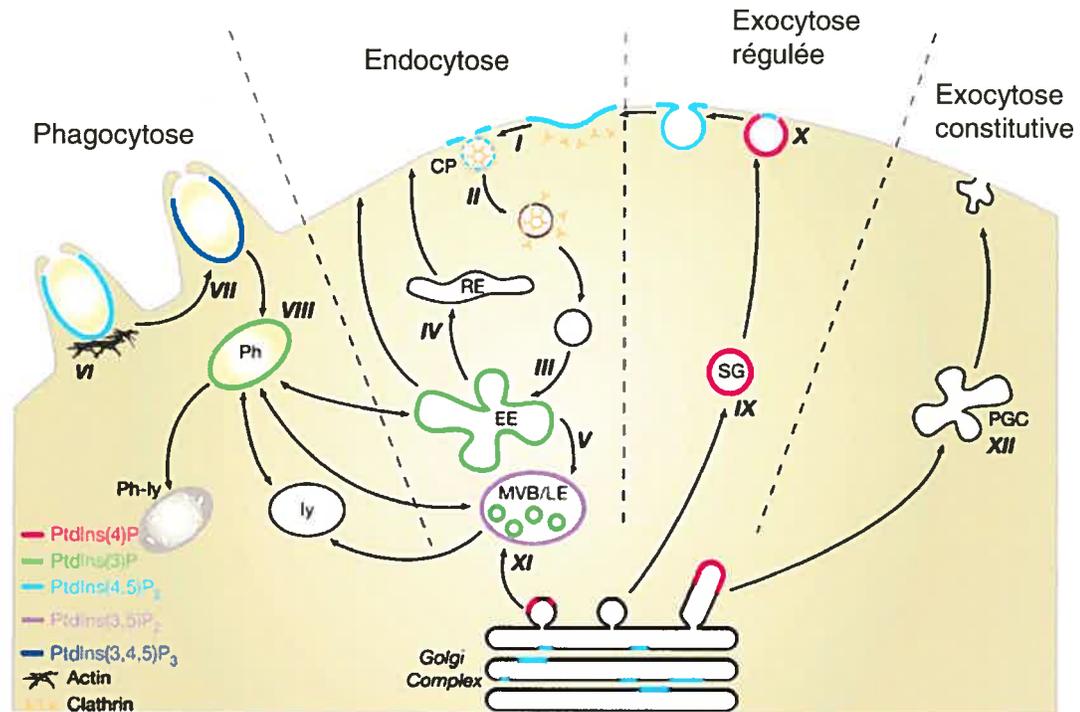
Seules les positions 3', 4' et 5' peuvent être phosphorylées *in vivo*. Les groupements R et R' sont des chaînes acylées et pour les phosphoinositides naturels, R est généralement un stéarate et R' un arachidonate (Janmey and Lindberg, 2004).

La localisation subcellulaire de chacun des phosphoisoformes du PI est un sujet d'intérêt depuis plusieurs années. Cette localisation a été étudiée de façon indirecte en la corrélant avec la localisation des enzymes responsables de leur synthèse et de façon plus directe en utilisant des sondes protéiques reconnaissant chacun des PIs. Ces sondes, sont en fait des domaines protéiques qui reconnaissent de façon plus ou moins spécifique un ou plusieurs PIs (voir section 1.3.3.1.). L'analyse combinée des données obtenues par ces deux approches permet d'établir une carte de localisation des PIs dans la cellule (Figure 1-15).

Le phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) est la forme monophosphorylée la plus abondante dans la cellule (~5% du total des PIs). Le PI4P se retrouve principalement sur la membrane de l'appareil de Golgi où il joue un rôle très important dans le maintien de l'intégrité de cette organelle (Wang et al., 2003).

Le phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) est également présent à des concentrations assez importantes et relativement stables dans la cellule (~0,20% des PIs). Le PI3P se retrouve principalement à la surface des endosomes et des endosomes tardifs (Gillooly et al., 2000). Il jouerait un rôle dans le ciblage des phagosomes vers les endosomes notamment en recrutant la protéine endosomale EEA1 (Rubino et al., 2000).

Il existe peu de données sur la localisation subcellulaire et la production de phosphatidylinositol 5-phosphate (PI5P). Il serait présent à la membrane plasmique et aussi sur les endosomes, et serait produit par une phosphatidylinositol 5-kinase (Tolias et al., 2000). La fonction de ce phospholipide est tout aussi nébuleuse et il reste encore à identifier des protéines pouvant interagir avec lui. Il est possible que le PI5P n'ait d'autre fonction que de servir de substrat à des phosphatidylinositol 4-kinases afin de produire de PI4,5P<sub>2</sub>.



**Figure 1-15. Site de production des divers phosphoinositides et leur implication dans le transport vésiculaire.**

Les chiffres romains (I à XII) indiquent les étapes de production ou de dégradation de ces phosphoinositides. I : Production de PI<sub>4,5</sub>P<sub>2</sub> durant l'endocytose et l'enrobage de clathrine (CP). II : ce niveau local de PI<sub>4,5</sub>P<sub>2</sub> est rapidement réduit par une inositol 5-phosphatase. III : le PI<sub>3</sub>P est présent presque exclusivement à la surface des endosomes précoces (EE) et des vésicules internes des corps multivésiculaires (MVB). IV : Le PI<sub>3</sub>P est déphosphosylé par une 3-phosphatase lors du recyclage des endosomes (RE). V : Le PI<sub>3</sub>P est converti en PI<sub>3,5</sub>P<sub>2</sub> par le 5-kinase PIK-FYVE à la surface des endosomes tardifs (LE) et des MVB. VI : Le PI<sub>4,5</sub>P<sub>2</sub> est aussi produit de façon locale lors de la phagocytose. VII : Le PI<sub>4,5</sub>P<sub>2</sub> est transformé en PI<sub>3,4,5</sub>P<sub>3</sub> par une PI3K de classe I. VIII : Par la suite la production de PI<sub>3</sub>P par la PI3K de type III est requise pour la maturation du phagosome. Ph, phagosome; Ph-ly, phagolysosome; Ly, lysosome. IX : Exocytose régulée implique la production de PI<sub>4</sub>P à la surface de l'appareil de Golgi et des granules sécrétoires (SG). X : Le PI<sub>4</sub>P est converti en PI<sub>4,5</sub>P<sub>2</sub> par une 5-kinase lors de l'amarrage et de la fusion du cargo avec la membrane plasmique. X et XI : le PI<sub>4</sub>P est aussi requis pour le transport du Golgi aux endosomes et à la membrane plasmique. PGC, cargo post-golgien (De Matteis and Godi, 2004).

Le phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PI3,4,5P<sub>3</sub> ou PIP<sub>3</sub>) et le phosphatidylinositol 3,4-biphosphate (PI3,4P<sub>2</sub>) sont présents en très faible quantité, (moins de 0,05% des PI) dans la cellule et leur concentration augmente de façon transitoire suite à certains stimuli qui active la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K, voir section 1.3.2.1.). Le PI3,4P<sub>2</sub> peut être produit par la déphosphorylation du PI3,4,5P<sub>3</sub> par une inositol polyphosphate 5-phosphatase (Inpp5) comme SHIP ou, alternativement, par l'action concertée d'une phosphatidylinositol 4-kinase (PI4K) et d'une PI3K sur le phosphatidylinositol (Domin et al., 1997; Turner et al., 1998). Le PIP<sub>3</sub> et le PI3,4P<sub>2</sub> sont responsables de l'activation de multiples voies de signalisation en aval de la PI3K et ont été impliqués dans de nombreux processus cellulaires comme la phagocytose, la survie, la croissance cellulaire et le remodelage du cytosquelette (Katso et al., 2001).

Le phosphatidylinositol 3,5-biphosphate (PI3,5P<sub>2</sub>) est un autre PI mal connu. On sait qu'il est produit à la surface des endosomes tardifs par la phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase PIK-FYVE (voir section 1.3.3.3) et qu'il est présent en concentrations plus importantes sur les endosomes multivésiculaires (MVE) (Whiteford et al., 1997; Dove et al., 2002). Le PI3,5P<sub>2</sub> permettrait donc de spécifier les MVE par rapport aux endosomes et serait important dans le trafic entre les MVE et les lysosomes (Rudge et al., 2004).

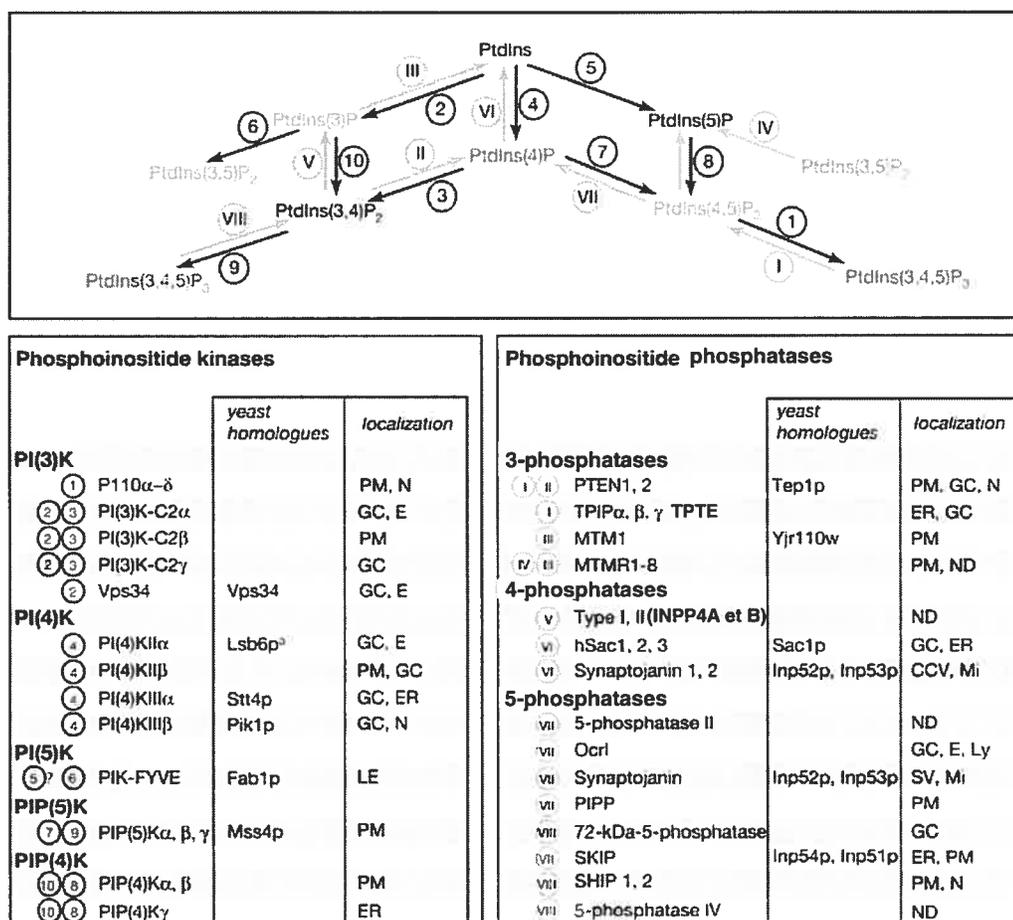
Le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PI4,5P<sub>2</sub> ou PIP<sub>2</sub>) est majoritairement présent à la membrane plasmique et est de loin le phosphatidylinositol biphosphate le plus abondant dans la cellule (5% des PIs). C'est probablement pour cette raison que parmi tous les phosphoinositides c'est le PI4,5P<sub>2</sub> qui a reçu le plus d'attention de la part des chercheurs au cours des 25 dernières années. Ce lipide exerce plusieurs fonctions dans la cellule et il a été montré qu'il était produit localement. Il est requis lors de la fusion de vésicules sécrétoires avec la membrane plasmique (Cremona and De Camilli, 2001; Martin, 2001), lors de réarrangement du cytosquelette d'actine (Coppolino et al., 2002; Cremona et al., 1999) et lors de l'endocytose régulée par les

clathrines (Ford et al., 2001; Itoh et al., 2001). Le  $PI4,5P_2$  est également présent en faible concentration à la surface du Golgi (Watt et al., 2002). Le rôle qu'il y jouerait n'est pas clair, mais il pourrait être impliqué dans l'exportation des vésicules recouvertes de clathrine à partir du réseau transgolgien (TGN)(Siddhanta and Shields, 1998). Finalement, le  $PI4,5P_2$  sert de substrat à la PI3K afin de produire du  $PIP_3$  et à la phospholipase C afin de produire de l' $IP_3$ .

Il existe également des dérivés solubles des PIs, constitués uniquement du groupement inositol phosphorylé en diverses positions (IP). La phospholipase C (PLC) est responsable de l'hydrolyse du  $PI4,5P_2$  en inositol-1,4,5 triphosphate ( $IP_3$ ) et en diacylglycérol qui demeure ancré à la membrane. Ces deux molécules peuvent agir comme second messenger, en stimulant l'entrée de calcium et l'activité de la protéine kinase C (PKC) respectivement. L' $IP_3$  tout comme les PIs peut être phosphorylé ou déphosphorylé à de multiples positions par plusieurs enzymes.

### **1.3.2. Enzyme de synthèse des phosphoinositides**

Le métabolisme des PIs est hautement compartimentalisé dans la cellule, puisque chaque organelle regroupe une série distincte de PI kinase et de PI phosphatase (voir Figure 1-16). La distribution, la régulation et l'équilibre local de l'activité de ces kinases et de ces phosphatases sont tels que la concentration des différents isoformes de PIs peut varier d'une organelle à l'autre. De plus, certains de ces enzymes présentent une distribution tissulaire particulière ou sont exprimés sous différents isoformes, ajoutant à la diversité de ce système.



**Figure 1-16. Kinases et phosphatases impliquées dans la synthèse et la dégradation des phosphoinositides.**

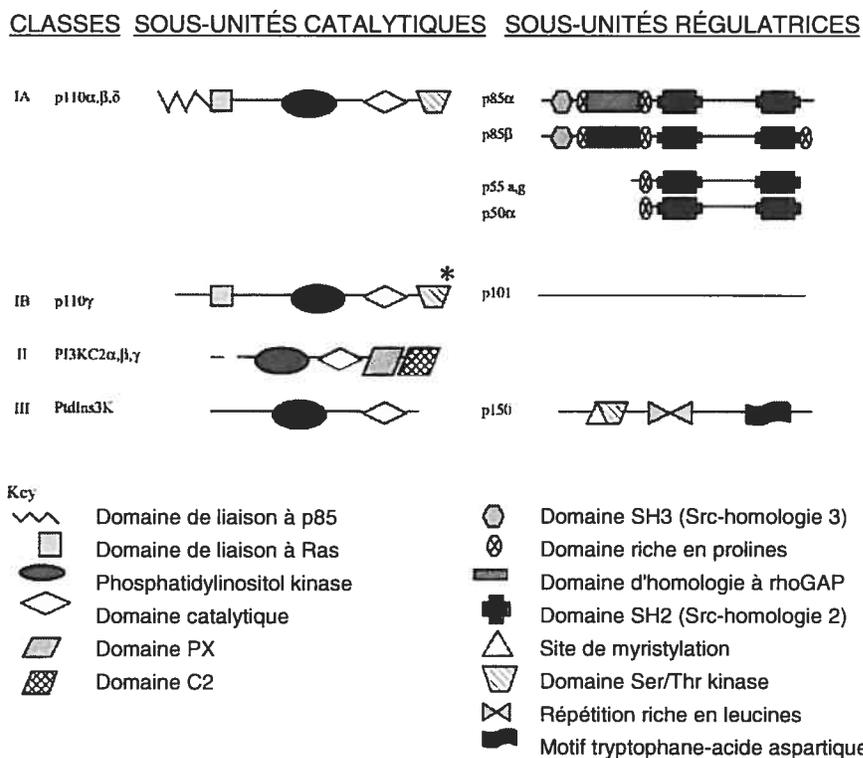
Les chiffres à gauche de chaque enzyme réfèrent à l'activité enzymatique de celui-ci représenté sur le schéma en haut. Pour chacun des enzymes l'homologue de levure, lorsqu'il est connu, est indiqué. La localisation subcellulaire est également indiquée. CCV; vésicules enrobées de clathrines; E, endosome; ER, réticulum endoplasmique; GC, appareil de Golgi; LE, endosome tardif; Ly, lysosome; Mi, mitochondries; N, noyau; PM, membrane plasmique; SV, vésicules synaptiques (De Matteis and Godi, 2004).

### 1.3.2.1. Phosphatidylinositol 3-kinases

Les phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) sont les enzymes les mieux caractérisées et les plus étudiées parmi celles impliquées dans la synthèse des divers PIs. Chez les mammifères, il existe huit PI3K différentes qui ont toutes la capacité enzymatique

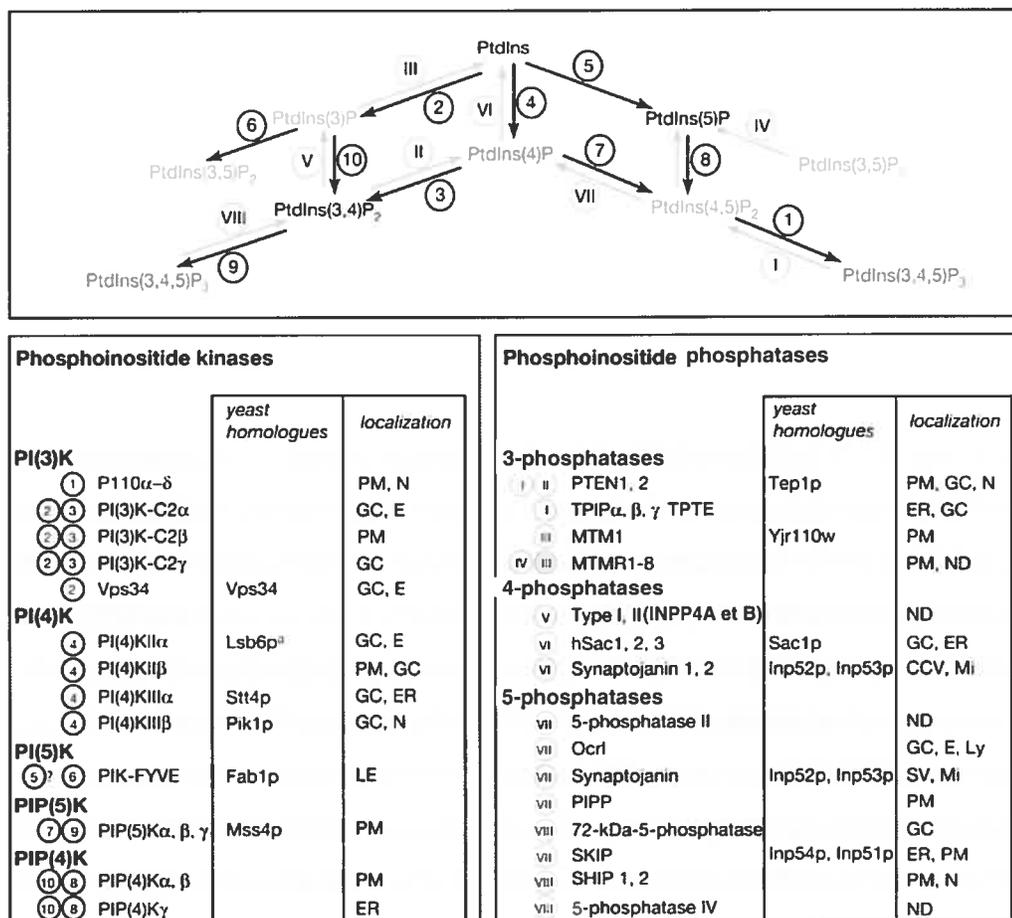
d'ajouter un groupement phosphate en position 3' sur un ou plusieurs phosphatidylinositol. En se basant sur leur structure, leur mode d'activation et leurs substrats, les PI3K ont été séparées en trois classes distinctes d'enzymes (voir figure 1-17).

*In vitro* les PI3K de classe I catalysent l'ajout d'un groupement phosphate en position 3' sur le phosphatidylinositol (PI), le PI4P et le PI4,5P<sub>2</sub>. Cependant, *in vivo*, le substrat principal des PI3K de classe I est le PI4,5P<sub>2</sub>. Par conséquent, le produit majeur synthétisé est le PI3,4,5P<sub>3</sub> et les PI3K de classe I devraient plus rigoureusement être appelées phosphatidylinositol 4,5-biphosphate 3-kinases. Chez les mammifères les PI3K de classe I sont divisées en deux sous-classes, IA et IB.



**Figure 1-17 : Structure des différentes PI3 kinases.**

Les motifs et domaines retrouvés dans ces protéines sont indiqués en bas (Golden and Insogna, 2004).



**Figure 1-16. Kinases et phosphatases impliquées dans la synthèse et la dégradation des phosphoinositides.**

Les chiffres à gauche de chaque enzyme réfèrent à l'activité enzymatique de celui-ci représenté sur le schéma en haut. Pour chacun des enzymes l'homologue de levure, lorsqu'il est connu, est indiqué. La localisation subcellulaire est également indiquée. CCV; vésicules enrobées de clathrines; E, endosome; ER, réticulum endoplasmique; GC, appareil de Golgi; LE, endosome tardif; Ly, lysosome; Mi, mitochondries; N, noyau; PM, membrane plasmique; SV, vésicules synaptiques (De Matteis and Godi, 2004).

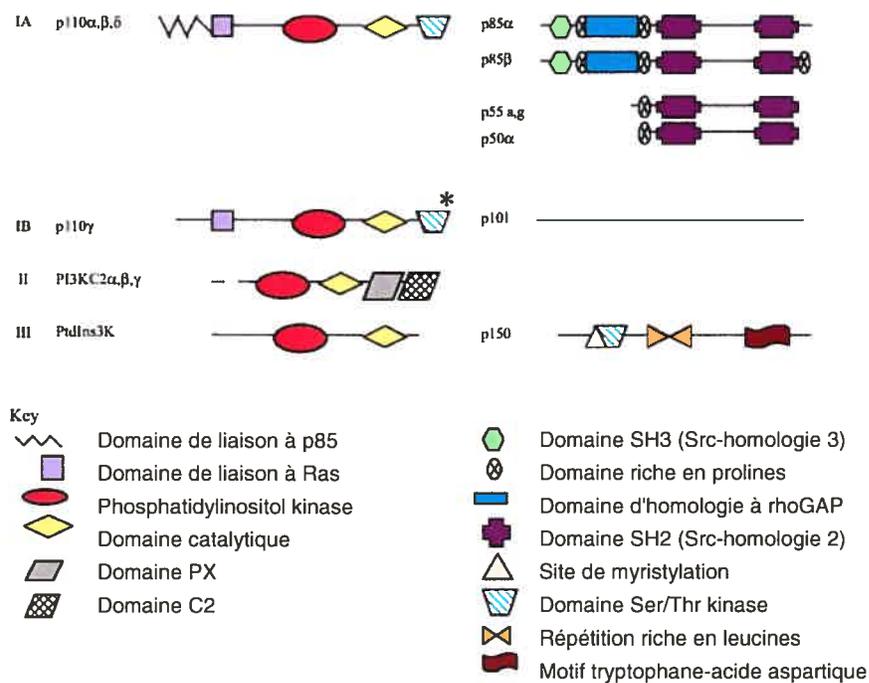
### 1.3.2.1. Phosphatidylinositol 3-kinases

Les phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) sont les enzymes les mieux caractérisées et les plus étudiées parmi celles impliquées dans la synthèse des divers PIs. Chez les mammifères, il existe huit PI3K différentes qui ont toutes la capacité enzymatique

d'ajouter un groupement phosphate en position 3' sur un ou plusieurs phosphatidylinositol. En se basant sur leur structure, leur mode d'activation et leurs substrats, les PI3K ont été séparées en trois classes distinctes d'enzymes (voir figure 1-17).

*In vitro* les PI3K de classe I catalysent l'ajout d'un groupement phosphate en position 3' sur le phosphatidylinositol (PI), le PI4P et le PI4,5P<sub>2</sub>. Cependant, *in vivo*, le substrat principal des PI3K de classe I est le PI4,5P<sub>2</sub>. Par conséquent, le produit majeur synthétisé est le PI3,4,5P<sub>3</sub> et les PI3K de classe I devraient plus rigoureusement être appelées phosphatidylinositol 4,5-biphosphate 3-kinases. Chez les mammifères les PI3K de classe I sont divisées en deux sous-classes, IA et IB.

#### CLASSES SOUS-UNITÉS CATALYTIQUES SOUS-UNITÉS RÉGULATRICES



**Figure 1-17 : Structure des différentes PI3 kinases.**

Les motifs et domaines retrouvés dans ces protéines sont indiqués en bas (Golden and Insogna, 2004).

Les PI3K de classe IA transmettent les signaux à partir de récepteurs couplés à une activité tyrosine kinase et se présentent sous la forme d'un hétérodimère entre une sous-unité catalytique p110 et une sous-unité régulatrice p85, p55 ou p50, communément appelée p85. Il y a trois p110 chez les mammifères, p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  et p110 $\delta$ , qui sont codés par trois gènes, *Pik3ca*, *Pik3cb* et *Pik3cd*. Ces protéines p110 se caractérisent par un domaine N-terminal de liaison à p85, un domaine de liaison à Ras, un domaine C2 et un domaine kinase. Chez l'humain et la souris, p110 $\alpha$  et p110 $\beta$  sont exprimées dans tous les tissus, alors que p110 $\delta$  est retrouvée principalement dans les lymphocytes (Chantry et al., 1997; Vanhaesebroeck et al., 1997b).

Les sous-unités catalytiques p110 sont associées de façon constitutive à une sous-unité régulatrice qui peut être p85 $\alpha$ , p55 $\alpha$ , p50 $\alpha$ , p85 $\beta$  ou p55 $\gamma$ . Pour des raisons historiques le terme p85 réfère généralement à la sous-unité régulatrice, que celle-ci soit une p85, une p55 ou une p50. p85 $\alpha$ , p55 $\alpha$  et p50 $\alpha$  sont codées à partir du même gène, *Pik3r1*, par des épissages alternatifs (Fruman et al., 1996), alors que p85 $\beta$  et p55 $\gamma$  sont codées par deux autres gènes, *Pik3r2* et *Pik3r3*. Toutes les sous-unités régulatrices de classe I contiennent deux domaines SH2 qui lient spécifiquement des tyrosines phosphorylées sur des récepteurs membranaires et sur d'autres protéines associées à ces récepteurs. La région située entre les deux domaines SH2 lie le domaine de liaison à p85 présent dans la sous-unité catalytique p110. La fonction principale des protéines p85 est donc de recruter la sous-unité catalytique à la membrane plasmique où se trouve ses substrats. De plus, la sous-unité régulatrice inhibe l'activité enzymatique de p110 en absence de signal et cette inhibition est levée lorsque les domaines SH2 de p85 interagissent avec des tyrosines phosphorylées (Yu et al., 1998a). Finalement, la sous-unité p85 stabilise la sous-unité p110 en retardant sa dégradation, ce qui explique pourquoi p110 n'est pas observée sous forme de monomère dans des conditions physiologiques (Yu et al., 1998b). Les isoformes p85 $\alpha$  et p85 $\beta$  contiennent également un domaine N-terminal SH3 et un

domaine homologue à Bcr (BH) , aussi appelé RBD (Ras binding domain), qui sont absents des sous-unités p50 et p55. Le domaine SH3 permet des interactions supplémentaires avec des protéines contenant des régions riches en prolines comme Sos et c-cbl. Ces interactions sont importantes pour le recrutement du dimère p110/p85 à la membrane (Kivens et al., 1998). Le domaine BH/RBD quant à lui, permettrait l'interaction de la sous-unité régulatrice avec des petites GTPases comme Rac et Cdc42 (Beeton et al., 1999; Tolias et al., 1995).

La classe IB contient une seule protéine, p110 $\gamma$ , qui ressemble au niveau structural et fonctionnel aux p110 de la classe IA, excepté qu'elle ne contient pas de domaine de liaison à p85 (Stoyanov et al., 1995). p110 $\gamma$  présente aussi un domaine N-terminal homologue à la pleckstrin (PH) qui pourrait être impliqué dans l'interaction de cette protéine avec des lipides. p110 $\gamma$  est activée par les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). La stimulation d'un GPCR mène à l'activation du complexe protéique hétérotrimériques G $\alpha\beta\gamma$  par l'échange du GDP pour un GTP sur la sous-unité G $\alpha$ . Cet échange permet la dissociation des sous-unités G $\beta\gamma$  qui peuvent activer p110 $\gamma$ . Ce mécanisme requiert une autre sous-unité régulatrice, p101, qui ne présente pas de similarité au niveau de sa séquence protéique avec les p85 (Krugmann et al., 1999) (Stephens et al., 1997).

Les PI3K de classe II ont deux substrats *in vitro*, le PI et PI4P (Arcaro et al., 1998). Certains résultats suggèrent cependant que le PI4,5P<sub>2</sub> puisse aussi être un substrat des PI3K de classe II (Gaidarov et al., 2001). La spécificité des PI3KC2 *in vivo* n'est pas démontrée. Cette classe regroupe trois enzymes chez les mammifères, PI3KC2 $\alpha$ , PI3KC2 $\beta$  et PI3KC2 $\gamma$ , qui sont codées par trois gènes, *Pik3c2a*, *Pik3c2b* et *Pik3c2c*. Les PI3KC2 sont des protéines d'environ 170 kDa et ne nécessitent pas de sous-unité régulatrice comme les enzymes de la classe I. Elles présentent également une organisation modulaire distincte avec un domaine N-terminal C2, un domaine de liaison à Ras, un motif de liaison aux phosphotyrosines, un domaine catalytique et un

domaine C-terminal C2. PI3KC2 $\alpha$  est localisée de façon prédominante dans le réseau *trans*-golgien et aux niveaux des vésicules recouvertes de clathrine (Domin et al., 2000; Prior and Clague, 1999). D'ailleurs, il a été montré que le domaine N-terminal de PI3KC2 $\alpha$  interagit avec les clathrines et que ces dernières pourraient servir à recruter cette enzyme au niveau des vésicules (Gaidarov et al., 2001). D'autres indices expérimentaux suggèrent que les enzymes de classe II sont activées en aval des récepteurs à activité tyrosine kinase, des récepteurs à cytokines et des intégrines (Arcaro et al., 2000; Brown et al., 1999; Turner et al., 1998; Urso et al., 1999).

La classe III des PI3K est représentée par une enzyme unique, PI3KIII, aussi appelée Vps34p d'après son homologue chez la levure (Schu et al., 1993; Volinia et al., 1995). Vps34p a comme seul substrat le phosphatidylinositol (PI) et comme seul produit le PI3P, ce qui en fait la seule véritable phosphatidylinositol 3-kinase des mammifères. Il en découle que la majorité du PI3P dans la cellule est produit par la PI3KIII (Vanhaesebroeck et al., 1997a). La sous-unité catalytique Vps34 se retrouve sous forme d'un complexe avec une sérine-thréonine kinase, p150/Vps15p, qui agirait comme sous-unité régulatrice afin de permettre le recrutement de Vps34p aux membranes (Panaretou et al., 1997). La PI3KIII serait localisée principalement sur les endosomes où elle joue un rôle prédominant dans le transport intracellulaire en générant le PI3P (Wurmser et al., 1999).

### 1.3.3.2. Phosphatidylinositol 4-kinases

Les phosphatidylinositol 4-kinases (PI4K) sont des enzymes capables de phosphoryler le phosphatidylinositol (PI) en position 4' et qui génèrent du PI4P. Il existe quatre PI4K chez les mammifères, classées selon deux types, type II et type III (la protéine type I étant en fait une PI3K). Les deux PI4K de type II, PI4KII $\alpha$  et PI4KII $\beta$ , sont codées par les gènes *Pi4k2a* et *Pi4k2b* respectivement, alors que

PI4KIII $\alpha$  et PI4KIII $\beta$  sont codés par les gènes *Pi4kca*, *Pi4kcb* (Nakagawa et al., 1996) (Balla et al., 1997; Barylko et al., 2001; Minogue et al., 2001).

La PI4KII $\alpha$  contribue de façon importante aux niveaux de PI4P dans la cellule et est localisée principalement à l'appareil de Golgi où elle joue un rôle important dans le transport vésiculaire du réseau *trans*-golgien (TGN). Son rôle est de produire le PI4P qui permet le recrutement des clathrines AP1 dans le TGN. Son inactivation à l'aide d'ARNi cause le relâchement de AP1 du Golgi et la fragmentation de cette organelle (Wang et al., 2003). La PI4KII $\beta$  est quant à elle une protéine cytoplasmique qui est recrutée à la membrane et activée par la petite GTPase Rac1 (Wei et al., 2002).

La PI4KIII $\alpha$  est localisée au réticulum endoplasmique, mais il n'existe jusqu'à présent aucun indice du rôle qu'elle pourrait jouer dans la cellule (Nakagawa et al., 1996). La PI4KIII $\beta$  est une protéine soluble qui est recrutée de façon dynamique à la membrane de l'appareil de Golgi. Ce recrutement de la PI4KIII $\beta$ , de même que son activation, dépendent de ARF1, une petite GTPase impliquée dans le transport vésiculaire (Godi et al., 1999).

### 1.3.3.3. Phosphatidylinositol phosphate 5-kinases

On regroupe dans la famille des phosphatidylinositol phosphate 5-kinase (PIP5K) quatre enzymes chez les mammifères, PIP5KI $\alpha$ , PIP5KI $\beta$ , PIP5KI $\gamma$  et PIK-FYVE (Ishihara et al., 1996; Loijens and Anderson, 1996; Itoh et al., 1998). Malheureusement, pour des raisons historiques, un malentendu entre la nomenclature chez la souris et l'humain perdure depuis l'identification de ces gènes chez les mammifères. PIP5KI $\alpha$  est l'homologue humain de Pip5kI $\beta$  chez la souris, alors que PIP5K $\beta$  est l'homologue de Pip5kI $\alpha$ . *In vivo* PIP5KI $\alpha$ , PIP5KI $\beta$  et PIP5KI $\gamma$  sont en fait des phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinases qui utilisent le PI4P comme substrat et qui sont responsables de la majorité de la production du PI4,5P<sub>2</sub> dans la

cellule. *In vitro* ces trois enzymes sont également capables de produire du PI5P, PI3,5P<sub>2</sub> et du PI3,4,5P<sub>3</sub> à partir de PI, du PI3P et du PI3,4P<sub>2</sub> respectivement, mais cette fonction n'est pas démontrée *in vivo* (Tolias et al., 1998; Fruman et al., 1998). PIK-FYVE est plutôt considérée comme une phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase puisqu'elle est responsable *in vivo* de la production de PI3,5P<sub>2</sub> à partir PI3P (Ikononov et al., 2002).

PIP5KI $\alpha$  et PIP5KI $\beta$  sont localisées principalement à la membrane plasmique, site le plus important de production PI4,5P<sub>2</sub>. Ce lipide est impliqué notamment dans le contrôle de la polymérisation de l'actine et la surexpression de PIP5KI $\beta$  provoque effectivement une polymérisation massive de l'actine dans la cellule (Shibasaki et al., 1997). En accord avec ces observations, d'autres expériences ont démontré que PIP5KI $\alpha$  et PIP5KI $\beta$  seraient des effecteurs importants de petites GTPases impliquées dans le remaniement du cytosquelette comme RhoA, Rac1 et Arf6 (Honda et al., 1999). PIP5KI $\gamma$  est la principale PIP5K présente au niveau des synapses dans le système nerveux et est un régulateur important du recyclage des vésicules synaptiques (Wenk et al., 2001).

PIK-FYVE, comme son nom l'indique, contient un domaine FYVE qui lie le PI3P présent sur la membrane endosomale (voir section 1.3.3.1.3.) et qui est essentiel à la localisation de cette enzyme à la surface des endosomes (Sbrissa et al., 2002). L'expression d'un mutant phosphatase inactive de cette enzyme provoque l'apparition anormale de vacuoles dans la cellule et ce phénotype peut être corrigé par la micro-injection de PI3,5P<sub>2</sub> dans le cytoplasme. Ces résultats indiquent que la production de PI3,5P<sub>2</sub> par PIK-FYVE est essentielle à l'intégrité du compartiment endosomal (Ikononov et al., 2002).

#### 1.3.3.4. Phosphatidylinositol phosphate 4-kinases

On a identifié trois enzymes capables de phosphoryler le phosphatidylinositol 5-phosphate en position 4', PIP4K $\alpha$ , PIP4K $\beta$  et PIP4K $\gamma$  (Bazenet et al., 1990) (Boronenkov and Anderson, 1995; Itoh et al., 1998). Ces enzymes ont d'abord été identifiées comme des PIP5K de type II capables de phosphoryler en position 5' une préparation commerciale de PI4P, c'est pourquoi ils ont initialement été nommés PIP5KII $\alpha$ , PIP5KII $\beta$  et PIP5KII $\gamma$ . On s'est aperçu par la suite que la préparation de PI4P, extraite de cerveau de bœuf, contenait également du PI5P qui est en fait le substrat utilisé par ces enzymes pour produire du PI4,5P<sub>2</sub> (Rameh et al., 1997). Les PIP4K peuvent également phosphoryler le PI3P afin de produire de PI3,4P<sub>2</sub> (Zhang et al., 1997). On possède très peu d'information sur le rôle de ces trois enzymes dans la cellule excepté que PIP4K $\beta$  localise partiellement au noyau et que PIP4K $\gamma$  est une protéine résidente du réticulum endoplasmique (Ciruela et al., 2000; Itoh et al., 1998).

Nous venons de voir dans cette section que de nombreuses enzymes sont impliquées dans l'ajout de groupement phosphate sur les différents phosphoinositides. Ces kinases permettent de générer sept différents phosphoinositides dans les membranes cellulaires. Ces phosphoinositides ont chacun des effets et des rôles distincts dans la cellule. J'aborderai, dans la prochaine section, différents modes d'action des phosphoinositides.

#### 1.3.3. Mécanisme d'action des phosphoinositides

On distingue trois mécanismes par lesquels des phospholipides membranaires comme les phosphoinositides peuvent modifier la fonction de protéines cytoplasmiques afin d'induire une cascade signalitique, un changement dans le cytosquelette, un transport vésiculaire donné ou tout autre évènement contrôlé par les PIs : 1) les PIs peuvent recruter spécifiquement une protéine à une membrane, modifiant ainsi sa localisation

cellulaire; 2) ils peuvent induire un changement dans la structure tertiaire de la protéine, exposant ainsi un domaine ou un module qui est normalement masqué; 3) les PIs peuvent aussi, dans certains cas, induire un changement conformationnel de la chaîne polypeptidique, modifiant ainsi la structure secondaire et l'activité de cette protéine.

### **1.3.3.1. Modules protéiques capables de lier les phosphoinositides**

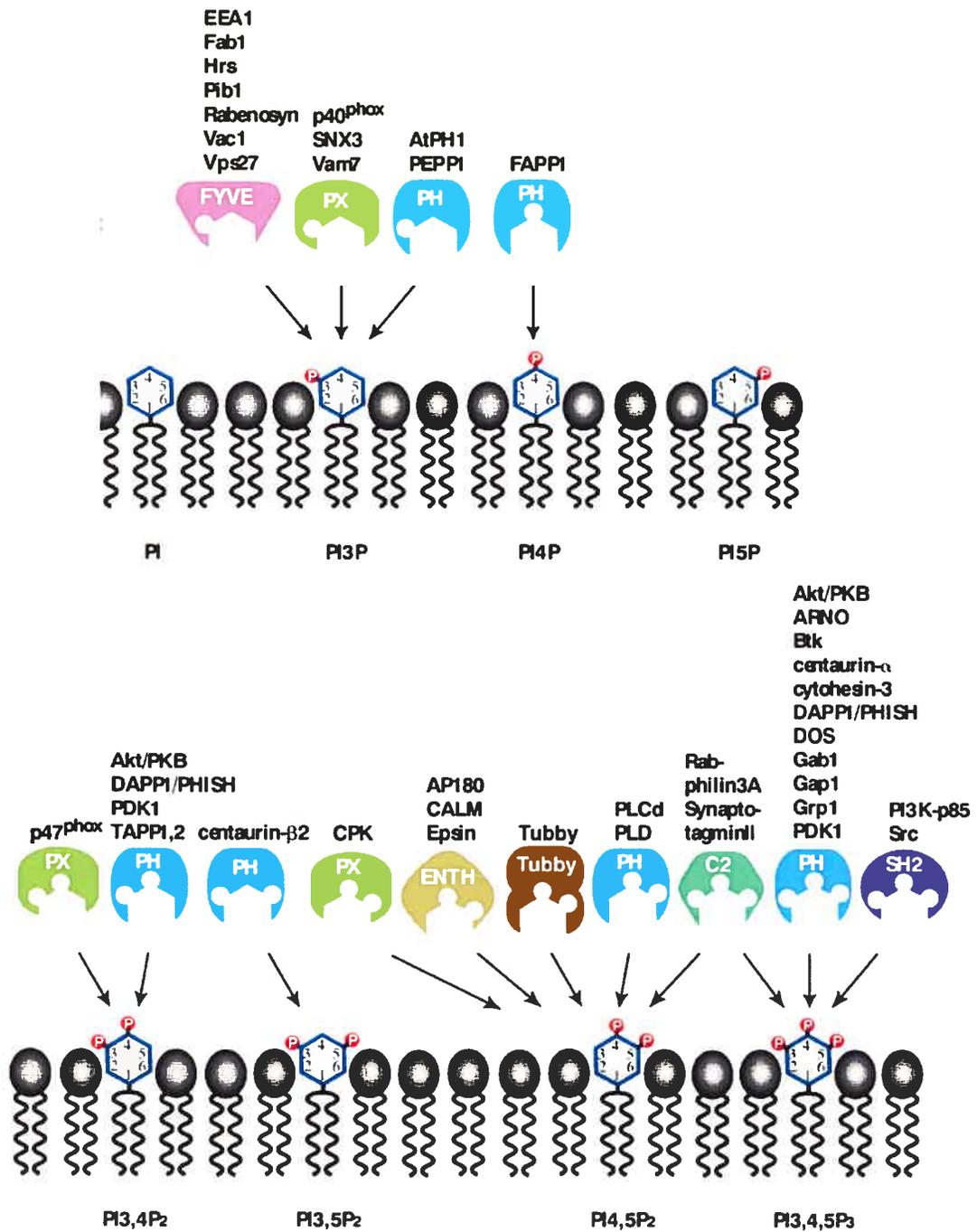
Le recrutement d'une protéine donnée à une membrane intracellulaire par un certain type de PI implique que cette protéine possède la capacité de lier de façon spécifique ce lipide. Ce recrutement permettra par exemple à une kinase de se retrouver en présence de son substrat ou vice versa. Comme c'est le cas pour les modules protéiques capable de reconnaître les phosphotyrosines (SH2, etc.), il existe un certain nombre de modules capables de reconnaître les groupements phosphoinositides et ces modules se retrouvent dans une grande variété de protéines. On a découvert et caractérisé au cours des dernières années, toute une série de ces domaines, les plus répandus et les mieux caractérisés étant les domaines PH, PX, FYVE et ENTH (voir Figure 1-18). Il existe aussi d'autres domaines, comme les domaines SH2 et C2, qui, dans certain cas, démontrent une capacité de liaison spécifique pour certain phosphoinositides.

#### **1.3.3.1.1. Domaines PH**

Le domaine homologue à la pleckstrine (PH) est le mieux caractérisé parmi les modules de reconnaissance des PIs. Depuis sa découverte en 1993 (Mayer et al., 1993; Haslam et al., 1993), cette séquence de 120 acides aminés a été trouvée dans plusieurs centaines de protéines chez l'humain et chez la souris (Schultz et al., 2000). Les domaines PH semblent très versatiles et seulement une minorité d'entre eux lient

véritablement les PIs, les autres ayant évolués afin d'adopter d'autres fonctions moléculaires. La structure du domaine PH se compose de l'empilement de sept feuillets beta recouvert d'une hélice alpha amphipatique en C-terminal (Hyvonen et al., 1995). Une série de boucles variables qui émergent d'un coin de l'empilement de feuillets beta forment une poche chargée positivement qui lie les PIs (voir figure 1-19)(Harlan et al., 1994).

La reconnaissance spécifique de six PIs différents par des domaines PH a été démontrée jusqu'à aujourd'hui (Figure 1-18). La cible la plus fréquente des domaines PH est le PI<sub>3,4,5</sub>P<sub>3</sub>. Ce lipide est lié fortement par le domaine PH de protéines recrutées à la membrane plasmique suite à un stimulus extracellulaire comme Btk (une tyrosine kinase de la famille de Tec), Grp1 (un facteur d'échange du GDP) et plusieurs autres protéines impliquées dans la transduction de signaux. D'autres tyrosine kinases comme AKT et des protéines adaptatrices comme DAPP1 lient aussi le PI<sub>3,4,5</sub>P<sub>3</sub> que le PI<sub>3,4</sub>P<sub>2</sub> via leur domaine PH. Cette double spécificité permettrait de maintenir ces protéines plus longtemps à la membrane plasmique, après que le PI<sub>3,4,5</sub>P<sub>3</sub> généré à la suite de l'engagement d'un récepteur a été converti en PI<sub>3,4</sub>P<sub>2</sub>, un PI ayant un plus longue durée de vie (Lemmon and Ferguson, 2000). Certains domaines PH lient spécifiquement les phosphatidylinositol monophosphates comme le PI<sub>3</sub>P et le PI<sub>4</sub>P. Au moins un domaines PH, celui de la centaurine β<sub>2</sub>, lie spécifique le PI<sub>3,5</sub>P<sub>2</sub>. Alors que les domaines PH de la PLCδ et de la spectrine présentent une affinité pour le PI<sub>4,5</sub>P<sub>2</sub> (Dowler et al., 2000).



**Figure 1-18. Représentation de divers modules protéiques capables de lier des phosphoinositides.**

Les ligands correspondant à chaque domaine sont indiqués en bas. Des exemples de protéines contenant chacun des domaines sont inscrits en haut (Overduin et al., 2001).

### 1.3.3.1.2. Domaines PX

Le domaine homologue à Phox (PX) est une séquence primaire de 120 acides aminés et nommée d'après la NADPH oxydase impliquée dans la phagocytose des pathogènes par les macrophages (Ponting, 1996). Environ cinquante protéines humaines contiendraient un domaine PX, la plupart étant localisées sur des membranes intracellulaires (Schultz et al., 2000). La structure du domaine PX de p47<sup>phox</sup> a permis de montrer que ce type de module protéique est composé de trois feuilletts beta antiparallèles suivis de trois hélices alpha (voir figure 1-19)(Hiroaki et al., 2001). La liaison au groupement inositol phosphorylé est assurée par un motif comprenant deux acides aminés basiques suivit d'une tyrosine ou d'une phénylalanine (RR $\phi$ ) et situé dans un sillon entre deux des hélices (Cheever et al., 2001).

La plupart des domaines PX caractérisés jusqu'à ce jour, incluant p40<sup>phox</sup> (une sous-unité de la NADPH oxydase), Vam7p (un SNARE chez la levure) et plusieurs nexines (SNX) se lient préférentiellement au PI3P (Ellson et al., 2001; Cheever et al., 2001; Xu et al., 2001). p47<sup>phox</sup> lie plutôt le PI3,4P<sub>2</sub> via son domaine PX, alors que la kinase Cpk lie plus spécifiquement le PI4,5P<sub>2</sub> (Kanai et al., 2001; Song et al., 2001).

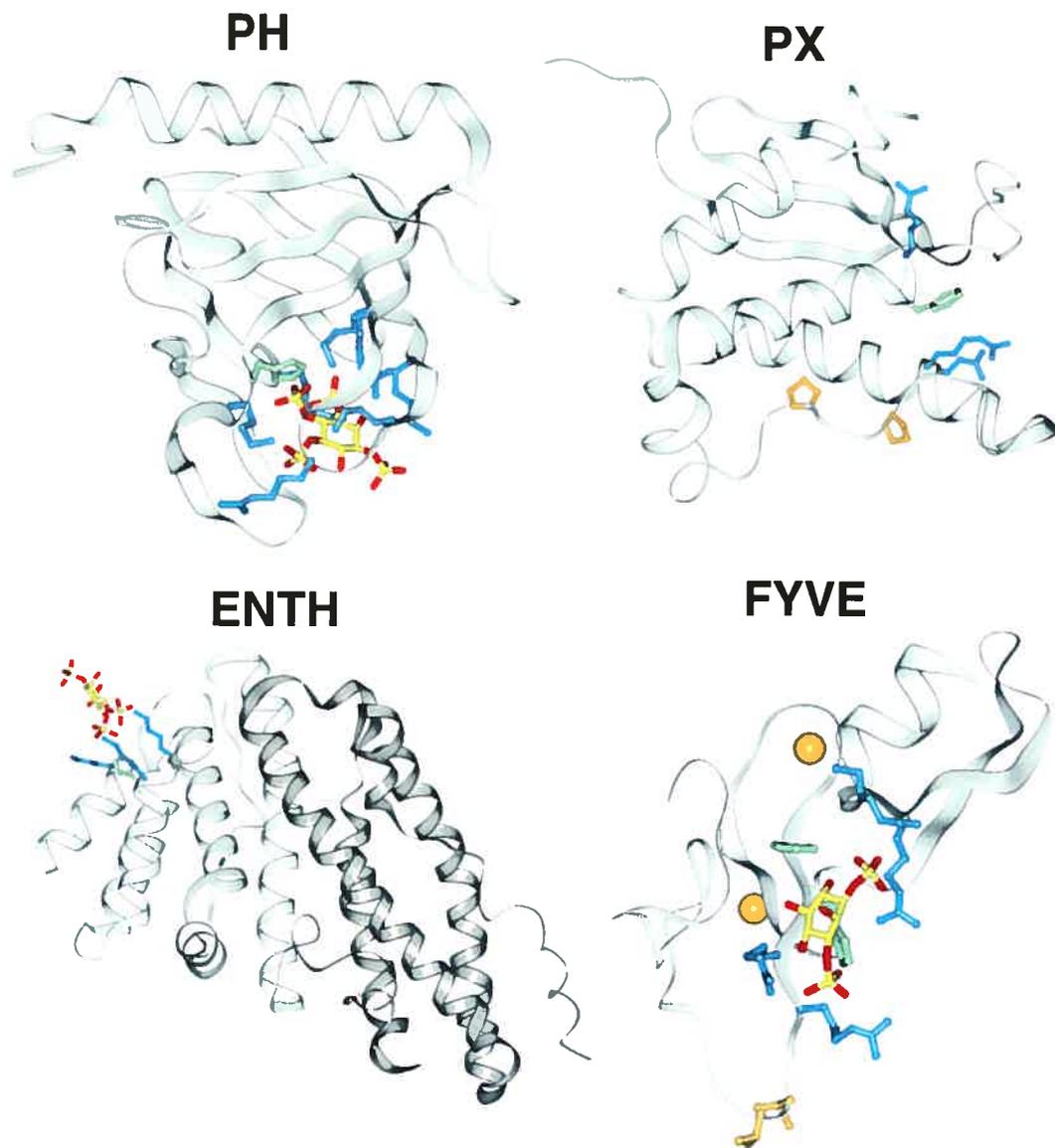
Les cellules phagocytaires utilisent la NADPH oxydase afin de détruire les microorganismes en générant des espèces réactives d'oxygène (ROS). Certaines des sous-unités de la NADPH oxydase, comme p40<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> et p47<sup>phox</sup>, sont localisées dans le cytoplasme. Suite à un événement d'activation, ces protéines sont transloquées à la membrane où résident les autres sous-unités catalytiques de la NADPH oxydase. Des PI kinases et des PI phosphatases sont requises afin de générer le PI3P et le PI3,4P<sub>2</sub> au niveau de la membrane du phagosome et permettre le recrutement des sous-unités p40<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> et p47<sup>phox</sup> (Ellson et al., 2001). Une mutation dans le motif basique (RR $\phi$ ) du domaine PX de p47<sup>phox</sup> est responsable d'un

défaut dans l'activation de la NADPH oxydase dans la granulomatose chronique (Noack et al., 2001).

#### **1.3.3.1.3. Domaines FYVE**

Le motif FYVE (aussi appelé RING FYVE et FYVE fingers) est composé de 65 acides aminés et a été découvert comme un domaine capable de lier spécifiquement le PI3P (Burd and Emr, 1998; Gaullier et al., 1998). Trente sept protéines chez l'humain contiendraient un domaine FYVE qui tire son nom de quatre de ces protéines, Fab1, YGLO23, Vsp27 et EEA1 (Kutateladze et al., 1999). Les domaines FYVE de EEA1, Hrs et Vsp37 présentent tous la même structure composée d'une paire de feuillets beta et d'une courte hélice alpha (voir figure 1-19). Deux ions de zinc, coordonnés chacun par quatre cystéines, stabilisent le repliement de ce motif (Kutateladze and Overduin, 2000; Misra and Hurley, 1999; Mao et al., 2000). Un motif conservé, RRHHCR, est essentiel à la liaison des groupements phosphate en position 1' et 3' du PI3P.

La grande majorité des protéines contenant un domaine FYVE sont impliquées dans le transport et la maturation des endosomes (Gillooly et al., 2001). Ceci s'explique par le fait que le PI3P est produit en grande quantité à la surface des endosomes par la PI3KIII (voir section 1.3.3.1.), alors que le domaine FYVE est le principal domaine de liaison au PI3P. La protéine EEA1 (early endosomal antigen 1) par exemple est recrutée aux endosomes par son domaine FYVE et est impliquée dans le recrutement d'un complexe incluant la petite GTPase Rab5 et des SNARE qui permettent la fusion entre les membranes vésiculaires (Simonsen et al., 1998). On retrouve aussi un domaine FYVE dans PIK-FYVE, une PI3P5K (voir section 1.3.3.3.), qui lui permet d'être recrutée au niveau des endosomes. Le même motif est présent dans les protéines de la famille des myotubularines (MTM et MTMRs) qui sont en fait des phosphatidylinositol 3-phosphatases (voir section 1.3.4.1.).



**Figure 1-19. Structure de quatre domaines de liaison aux phosphoinositides.**

Le domaine PH de Grp1 lié au PI<sub>3,4,5</sub>P<sub>3</sub>, le domaine PX de p47<sup>phox</sup> sans ligand, le domaine ENTH de CALM lié au PI<sub>4,5</sub>P<sub>2</sub> et le domaine FYVE de EEA1 lié au PI<sub>3</sub>P. Dans les quatre représentations les lysines et les arginines impliquées dans la liaison aux groupement phosphates sont en **bleu**. Dans la représentation du domaine PX deux prolines sont en **jaune** et un résidu phénylalanine est en **vert**. Dans les autres modèles, les histidines impliquées dans la liaison aux phosphoinositides sont en **vert** (Overduin et al., 2001).

#### 1.3.3.1.4. Domaines ENTH

Le domaine « Epsin N-terminal homology » (ENTH aussi ANTH) est présent dans des protéines comme AP180, CALM et l'Epsin impliquées dans l'endocytose et plus précisément dans l'assemblage des clathrines (Kay et al., 1999). Les domaines ENTH, formés de neuf hélices alpha, lient spécifiquement le PI4,5P<sub>2</sub> via un site de liaison qui inclut trois lysines et une histidine (voir figure 1-19)(Itoh et al., 2001). Il est surprenant de constater que le domaine ENTH est le plus gros des modules de liaison aux PI, alors qu'il présente pourtant le plus petit site de liaison au PI. Il semble que ce domaine soit aussi impliqué dans des interactions avec d'autres protéines. C'est le cas pour CALM dont l'interaction avec les clathrines dépend de son domaine ENTH, et de l'Epsin qui interagit avec des facteurs de transcription via son motif ENTH (Tebar et al., 1999; Hyman et al., 2000).

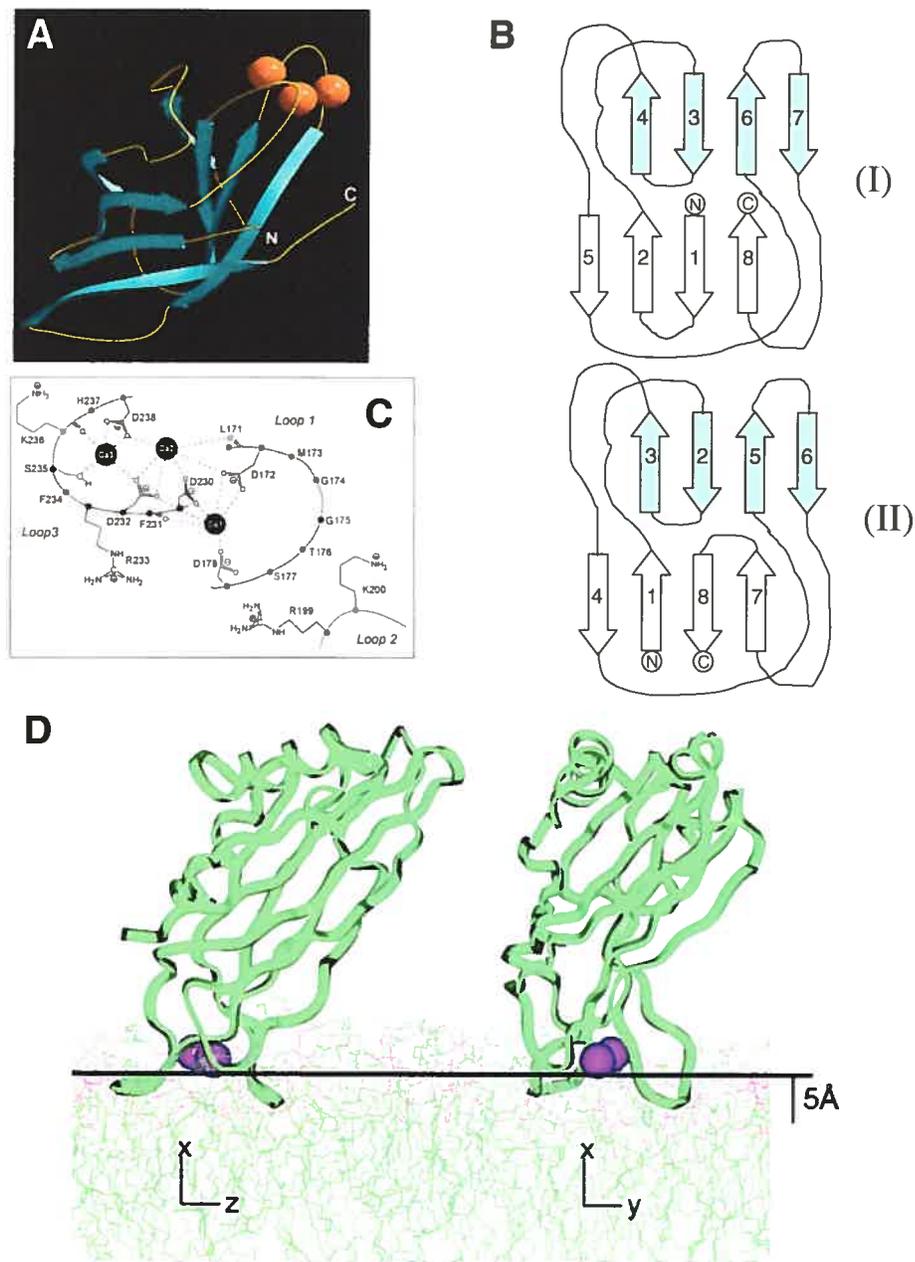
#### 1.3.3.1.5. Domaines C2

Les domaines C2 reconnaissent les phospholipides acides, comme l'acide phosphatidique, et ont été identifiés d'abord comme la deuxième région conservée de la protéine kinase C (PKC) (Parker et al., 1986). Environ 200 protéines humaines contiennent ce motif de 130 acides aminés, incluant des phospholipases, des PI3-kinases, des PI phosphatases et des synaptotagmines. La structure du domaine C2 est un empilement de huit feuillets beta, formant un motif de « clé grec » (Figure 1-19b A). Il existe deux topologies de C2, I et II, qui présentent simplement une permutation entre les feuillets 1 et 8 (Figure 1-19b B). Des boucles reliant les feuillets beta entre eux coordonnent des ions calcium (2-3) via des résidus d'acide aspartique (Hurley and Misra, 2000) (Figure 1-19b A et C).

Les domaines C2 peuvent lier les phospholipides membranaires de façon calcium dépendante ou indépendante, d'autres peuvent interagir avec des protéines

cytoplasmiques. Dans le cas, où la liaison aux lipides dépend du calcium, comme on peut le voir à la figure 1-19bD pour le domaine C2B de la synaptotagmine I, le site de liaison au calcium est aussi le site d'interaction avec l'interface membranaire (Rufener et al., 2005; Fernandez et al., 2001). Des résidus chargés positivement (basiques), également situés près du site de liaison au calcium, sont impliqués dans l'interaction avec les phospholipides de façon plus ou moins spécifique. En fait, les boucles impliquées dans la liaison des ions  $\text{Ca}^{2+}$  pénètrent même la couche lipidique. (Figure 1-19bD). De façon intéressante, ce même domaine C2B de la synaptotagmine I interagit de façon calcium dépendante avec les bicouches de phospholipides riches en phosphatidylcholine et phosphatidylserine (PC/PS), alors qu'il peut aussi interagir de façon calcium indépendante avec le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PI4,5P2) (Rufener et al., 2005).

D'autres études ont permis de montrer que certaines protéines contiennent un domaine C2 qui lie spécifiquement des groupements inositols phosphorylés. La rabphiline 3A et la synaptotagmine II, par exemple, lient le PI3,4,5P3 et le PI4,5P2 via leur domaine C2 (Mehrotra et al., 2000; Chung et al., 1998). Dans le cas de la synaptotagmine II la liaison aux PI implique un groupement d'acides aminés basiques qui sont à peu près conservés chez la rabphiline 3A. Considérant le nombre important de protéines qui contiennent un domaine C2, il est fort probable que plusieurs autres de ces domaines aient évolué de façon à lier spécifiquement des PIs.



**Figure 1-19b. Structure des domaines C2 et liaison au calcium et aux phospholipides.**

**A)** Structure du domaine C2A de la Synaptotagmine I. Les huit feuillets beta sont représentés en bleu et trois ions  $\text{Ca}^{2+}$  sont représentés en orange. Ce domaine C2 est de topologie I. **B)** Représentation des deux types de topologie de C2. **C)** Représentation des trois sites de liaison au calcium du domaine C2A de la Synaptotagmine I. **D)** Orientation et position du domaine C2B de la synaptotagmine I sur une bicouche de phospholipides composées de 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) et de 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoserine (POPS). (Rufener et al., 2005; Fernandez et al., 2001).

### 1.3.3.1.6. Autres motifs : Tubby, SH2 et DHR-1

Pour les cinq domaines dont je viens de discuter, à l'exception des domaines C2, la liaison spécifique aux phosphoinositides est la règle générale. Par contre, il existe d'autres domaines protéiques pour qui la liaison à certains PI est une exception. En particulier, certains domaines Tubby et SH2 lient les phosphoinositides avec plus ou moins de spécificité. Un autre motif, récemment identifié, DHR-1, lie spécifiquement le PI3,4,5P<sub>3</sub>.

Il a été montré que le domaine SH2 de l'oncogène c-src et celui de sous-unités régulatrices p85 de la PI3K pouvaient interagir avec le PI3,4,5P<sub>3</sub>. De plus, cette interaction est en compétition avec le ligand plus typique de ces domaines SH2, les phosphotyrosines (Rameh et al., 1995). Un mécanisme similaire a été décrit pour l'interaction du motif SH2 de la PLCγ avec le PI3,4,5P<sub>3</sub> (Rameh et al., 1998).

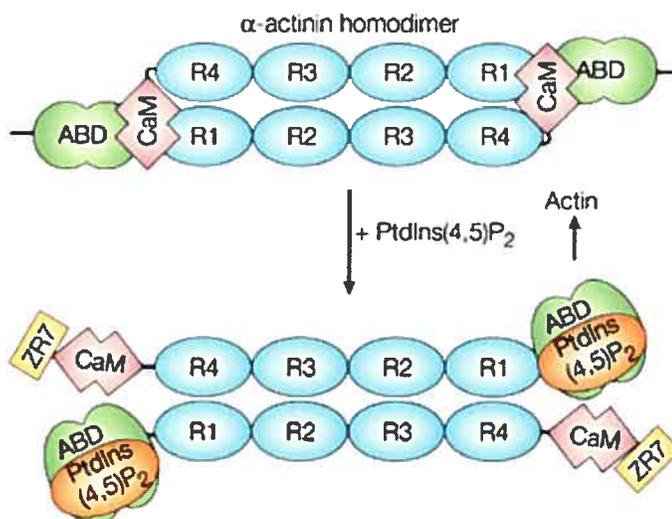
Le domaine tubby se retrouve dans au moins quatre protéines humaines, dont la protéine Tubby. Cette séquence de 260 acides aminés forme un baril beta contenant une hélice alpha. L'extérieur du baril tubby contient une poche basique conservée qui peut lier le PI4,5P<sub>2</sub>, le PI3,4P<sub>2</sub> et le PI3,4,5P<sub>3</sub> (Santagata et al., 2001). Cette liaison servirait, en présence de PI4,5P<sub>2</sub>, à séquestrer Tubby à la membrane plasmique jusqu'à ce que la phospholipase C clive le PI4,5P<sub>2</sub>, libérant ainsi la protéine afin qu'elle puisse entrer dans le noyau pour réguler la transcription de certains gènes.

Récemment, un nouveau motif de liaison au PI3,4,5P<sub>3</sub> a été identifié dans la protéine DOCK180, un facteur échange du GDP pour la GTPase Rac (Cote et al., 2005). Ce motif appelé DHR-1 (DOCK homology region-1) et qui présente une certaine ressemblance avec un domaine C2, interagit *in vitro* et *in vivo* avec le PI3,4,5P<sub>3</sub> et permet le recrutement de DOCK180 à l'apex de la cellule en migration. Ce recrutement est essentiel pour que DOCK180 puisse agir sur Rac et permet de relier

la production de PI3,4,5P<sub>3</sub> et l'activation de Rac, deux phénomènes impliqués dans la migration cellulaire.

### **1.3.3.2. Autres modes d'action**

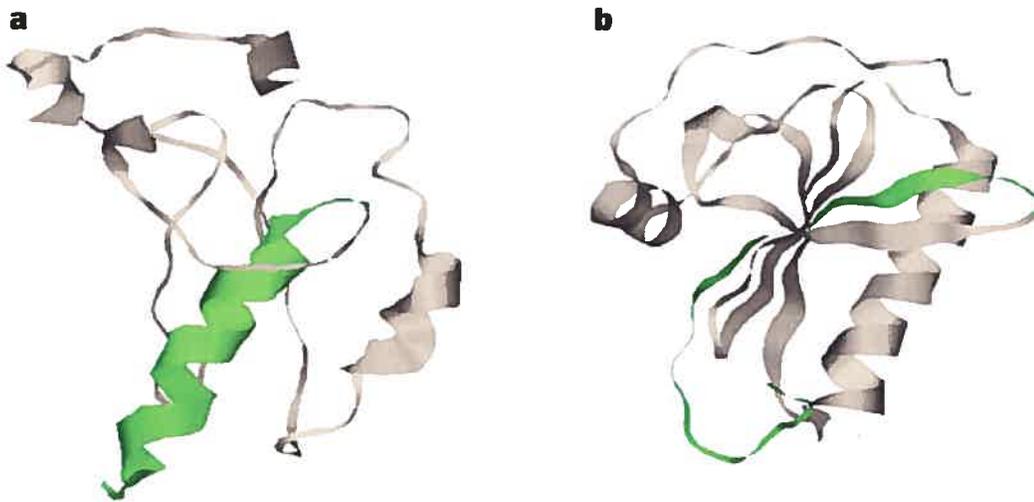
Un autre mode d'action des PI sur les protéines est l'induction d'un changement dans la structure tertiaire suite à leur interaction. Il en résulte un dépliement de la protéine qui permet l'exposition de domaines normalement masqués en absence de PI. Un exemple frappant de ce type de mécanisme est l'effet du PI4,5P<sub>2</sub> sur l' $\alpha$ -actinine. Cette protéine lie les filaments d'actine entre eux ou à d'autres protéines dans les adhésions focales (Young and Gautel, 2000). En absence de PI4,5P<sub>2</sub> l' $\alpha$ -actinine existe sous la forme d'un homodimère antiparallèle dans lequel les sites de liaison pour l'actine et la titine sont cachés par leur liaison à un site inhibiteur complémentaire (Figure 1-20). La liaison au PI4,5P<sub>2</sub> induit un changement dans la structure de l' $\alpha$ -actinine et relâche ces liaisons autoinhibitrices, ce qui permet la liaison à la titine et à l'actine. Des mécanismes similaires contrôleraient l'activité d'autres protéines du cytosquelette comme la taline, N-WASP, la vinculine et les protéines de la famille ERM (Hilpela et al., 2004; Sechi and Wehland, 2000).



**Figure 1-20. Activation de l'α-actinine par sa liaison au PI4,5P<sub>2</sub>.**

Représentation schématique des domaines fonctionnels de l'homodimère d'α-actinine et des changements conformationnels qui se produisent suite à la liaison aux phosphoinositides. Ces changements conformationnels impliquent particulièrement l'exposition du site de liaison à l'actine (ABD) et du site de liaison aux motifs ZR7 de la titine (CaM) (Janmey and Lindberg, 2004).

L'inactivation de certaines protéines liant l'actine peut également être accomplie par le PI4,5P<sub>2</sub> en induisant un réarrangement de la structure polypeptidique. Par exemple, des études spectroscopiques de la profiline ont montré que la liaison de cette protéine au PI4,5P<sub>2</sub> augmente le contenu en hélices alpha et induit d'autres changements dans la structure secondaire (Raghunathan et al., 1992). Des changements similaires ont lieu dans la gelsoline lors de sa liaison au PI4,5P<sub>2</sub> (Xian and Janmey, 2002). La gelsoline est une protéine qui coiffe les filaments d'actine, empêchant leur élongation. En présence de PI4,5P<sub>2</sub>, cependant, sa structure se modifie la rendant incapable de lier l'actine et libérant les extrémités des filaments. Dans la protéine repliée et liée à l'actine, le domaine de liaison au PI de la gelsoline se trouve sous la forme d'un feuillet beta qui stabilise la structure du domaine de liaison à l'actine dans la protéine (Figure 1-21). Lorsque lié au PI4,5P<sub>2</sub> cette partie de la protéine prend une conformation en hélice alpha et cette transformation induit la désorganisation de tout le domaine de liaison à l'actine (Puius et al., 2000).



**Figure 1-21. Inactivation du domaine de liaison à l'actine de la gelsoline par la liaison aux phosphoinositides.**

La liaison au  $PI4,5P_2$  induit un changement dans la structure secondaire et tertiaire de la gelsoline. **a)** En présence de phosphoinositide (PI) le domaine de liaison au PI est une hélice alpha (**vert**) qui modifie la structure du domaine de liaison au PI et induit un changement conformationnel qui affecte également le site de liaison à l'actine. **b)** En absence de  $PI4,5P_2$  le domaine potentiel de liaison au PI prend la forme d'un feuillet beta (**vert**) qui stabilise la structure du domaine de liaison à l'actine dans la protéine (Janmey and Lindberg, 2004).

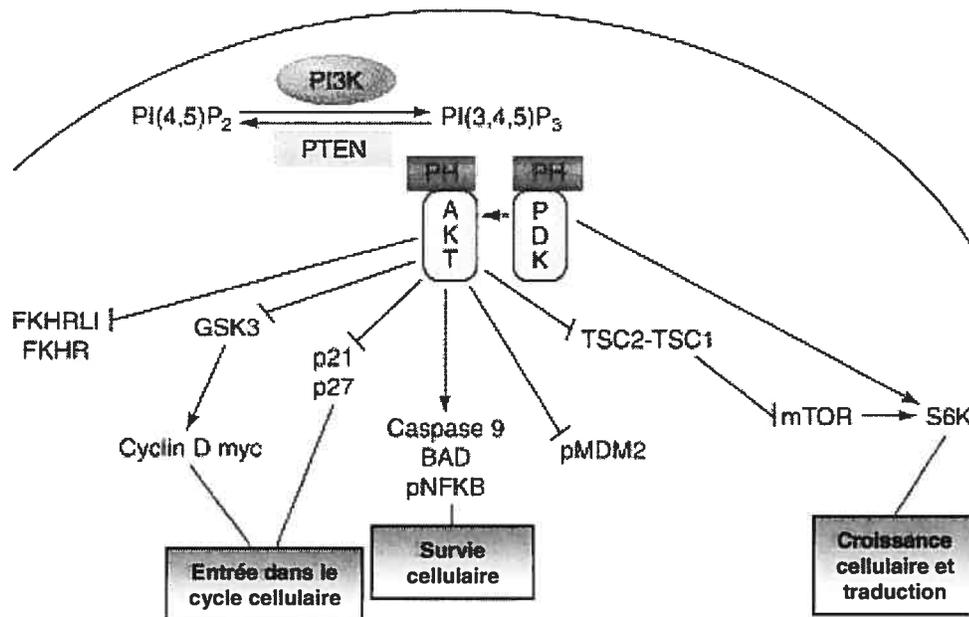
Nous avons vu dans cette section que les phosphoinositides font appel à plusieurs mécanismes afin d'induire des changements moléculaires dans la cellule. L'implication d'une dizaine de modules capables de lier les PIs que l'on retrouve dans des centaines de protéines, illustre bien l'incroyable diversité des voies de signalisation contrôlées par les PIs. La caractérisation de la spécificité de liaison de chacun de ces motifs pour les divers PIs sera l'un des enjeux de taille dans le domaine des phospholipides aux cours des prochaines années. J'ai expliqué comment des kinases pouvaient produire les différents dérivés phosphorylés du PI et comment ces divers PIs pouvaient affecter des processus cellulaires. Nous verrons dans la prochaine section comment une série de phosphatases est impliquée dans la régulation négative des signaux induits par les PIs.

### 1.3.4. Régulation négative par les phosphatidylinositol phosphatases

Dans les cellules eucaryotes la phosphorylation des résidus tyrosine, thréonine et sérine par des kinases est contrebalancée par l'action de phosphatases. D'une façon analogue, il existe des phosphatases capables de déphosphoryler les phosphoinositides sur des positions précises. Ainsi, il existe chez les mammifères des phosphatidylinositol 3-, 4- et 5-phosphatases qui contrebalancent l'activité des kinases décrites précédemment. La particularité des phosphatidylinositol phosphatases ou des inositol polyphosphate phosphatases par rapport aux protéines phosphatases est que suite à la déphosphorylation d'un PI donné elles génèrent un autre PI. Ainsi, il serait faux de considérer que ces enzymes ont comme fonction de mettre fin à un signal donné, puisqu'elles peuvent dans tous les cas en générer elles-mêmes un nouveau. L'existence de ces phosphatases ajoute donc encore un niveau de complexité de plus au système des phosphoinositides. Comme c'est le cas pour les PI kinases, il existe une régulation spatio-temporelle des PI phosphatases (voir figure 1-16). Certaines sont également présentes sous différentes isoformes résultant d'épissages alternatifs de leur ARNm. J'aborderai dans cette section les fonctions enzymatiques et biologiques des différentes inositol phosphatases et plus particulièrement des inositol polyphosphate 4-phosphatases, sujets des études expérimentales présentées dans cette thèse.

#### 1.3.4.1. 3-phosphatases : PTEN, myotubularines et MTMRs

On connaît présentement deux types de phosphatidylinositol 3-phosphatase, les phosphatases apparentées à PTEN et celles apparentées à la myotubularine MTM1. Les phosphatases de la famille PTEN sont des phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate 3-phosphatases, alors que la myotubularine (MTM1) et les protéines de la famille des myotubularines (MTMR) sont en règle générale des phosphatidylinositol 3-phosphatases.



**Figure 1-22. Régulation négative de la voie PI3 kinase/AKT par la phosphatidylinositol 3-phosphatase PTEN.**

PTEN a un impact négatif sur la croissance, la survie et la division cellulaire (Sulis and Parsons, 2003).

La famille PTEN regroupe quatre enzymes chez les mammifères, PTEN, PTEN2, TPTE et TPIP. PTEN (phosphatase and tensin homolog on chromosome ten), aussi connue sous le nom de MMAC1 (mutated in multiple advanced cancers 1), est de loin le membre le mieux caractérisé de cette famille. PTEN est un gène suppresseur de tumeur localisé sur le chromosome 10q23. Des mutations germinales dans PTEN sont associées à quatre syndromes autosomal-dominant : les syndromes de Cowden, de Lhermitte-Duclos, de Bannayan-Zonana et de Proteus. Les patients souffrant de ces syndromes présentent tous une prédisposition à développer des hamartomes (tumeur constituée par une malformation due à une anomalie dans la genèse d'un organe ou d'un tissu avant la naissance) ou d'autres tumeurs bénignes (Cantley and Neel, 1999). De plus, des mutations somatiques dans PTEN ont été identifiées dans un grand nombre de tumeurs malignes. Ces mutations se caractérisent toujours par une absence d'expression de PTEN et une inactivation des deux allèles de ce gène, deux caractéristiques que l'on associe généralement aux gènes suppresseurs de tumeurs

(Simpson and Parsons, 2001). Les souris déficientes en PTEN meurent *in utero* très tôt au cours du développement. Par contre les souris hétérozygotes *Pten*<sup>+/-</sup> sont viables, mais développent plusieurs types de tumeurs (Di Cristofano et al., 1998; Podsypanina et al., 1999).

PTEN présente un domaine C2 et un domaine tyrosine-phosphatase possédant une double spécificité pour les lipides et les protéines (Maehama and Dixon, 1999). *In vitro*, on a identifié certains substrats phospho-protéiques de PTEN, notamment Shc et de récepteur du PDGF (Gu et al., 1999; Mahimainathan and Choudhury, 2004). Cependant, il apparaît de plus en plus évident que l'activité lipide-phosphatase de PTEN est la plus importante *in vivo*. L'activité lipide-phosphatase de PTEN est très spécifique. PTEN reconnaît uniquement le PI3,4,5P<sub>3</sub> et le déphosphoryle en position 3', générant du PI4,5P<sub>2</sub>. Cette spécificité est d'autant plus remarquable que la fonction enzymatique de PTEN est exactement l'inverse de celle des PI3 kinases de classe I (voir section 1.3.2.1.). De nombreuses études ont en effet démontré que le rôle de PTEN est de contrôler de façon négative la voie PI3K/AKT (voir section 1.2.2.2.2.4.). Cette action négative de PTEN permet de réguler les signaux de prolifération, de survie et de croissance induit par la PI3K et par AKT (voir figure 1-22). En absence de PTEN la plupart des cellules présentent des niveaux élevés de PI3,4,5P<sub>3</sub>, de AKT phosphorylée et de p70 S6 kinase phosphorylée (S6K) (Crackower et al., 2002). Ces cellules se caractérisent également par une augmentation de la prolifération et de la croissance cellulaire et par une réduction de l'apoptose.

*PTEN* est un gène ubiquiste et est donc exprimé dans tous les tissus. De plus, PTEN est présent chez tous les eucaryotes, incluant la levure. Les autres membres de la famille PTEN, soient TPTE, PTEN2 et TPIP, sont spécifiques aux mammifères. Alors que PTEN est une protéine cytoplasmique, recrutée à la membrane dans des conditions particulières, les trois autres membres présentent tous la caractéristique d'avoir des domaines transmembranaires dans leur partie N-terminale. TPTE, PTEN2

et TPIP présentent la même spécificité enzymatique que PTEN envers le PI3,4,5P<sub>3</sub>. Cependant, leur expression tissulaire est plus restreinte, TPTE et PTEN2 étant exprimés uniquement dans les testicules, et TPIP étant exprimé seulement au niveau des testicules, du cerveau et de l'estomac (Chen et al., 1999; Wu et al., 2001; Walker et al., 2001b). Finalement, ces trois protéines semblent localisées à l'appareil de Golgi et au réticulum endoplasmique via leurs domaines transmembranaires. Donc, bien qu'ayant la même activité enzymatique que PTEN, la spécificité de ces enzymes est probablement basée sur une localisation différentielle.

La myotubularine (MTM1) a été identifiée initialement comme le gène muté dans la myopathie myotubulaire liée au chromosome X, une maladie du développement musculaire. Des mutations dans *MTMR2*, un gène apparenté à la MTM1, sont responsables du type 4B du syndrome de Charcot-Marie-Tooth, une neuropathie motrice et sensorielle (Maehama et al., 2001). En tout, chez l'humain, il existe huit phosphatases apparentées aux myotubularines, MTMR1-8. MTM1, MTMR2, MTMR3 et MTMR6 sont des phosphatidylinositol 3-phosphatases qui déphosphorylent le PI3P et génèrent du PI. Ces enzymes ont également une activité 3-phosphatase contre le PI3,5P<sub>2</sub> (Schaletzky et al., 2003; Taylor et al., 2000). Le rôle biologique des membres de la famille MTM, de même que leur lien avec les deux pathologies énoncées plus haut, demeurent inconnu. Cependant, la spécificité de ces enzymes envers le PI3P et le PI3,5P<sub>2</sub>, suggère qu'elles pourraient être impliquées dans le contrôle de la concentration de ces lipides à la surface des endosomes. De plus, MTMR3 contient un domaine FYVE capable de lier le PI3P et donc, possiblement, de permettre le recrutement de cette phosphatase aux membranes endosomales (Walker et al., 2001a).

#### **1.3.4.2. 5-phosphatases : OCRL, SHIP, et autres Inpp5**

Parmi les inositol phosphatases, les 5-phosphatases forment le groupe le plus large et le plus hétérogène. Le grand nombre d'enzymes et le fait qu'ils aient été clonés par des groupes indépendants, fait de la nomenclature un véritable casse-tête pour cette famille d'enzymes. J'ai essayé ici de rétablir un peu d'ordre en me basant sur une nomenclature relativement simple élaborée par Philip W. Majerus en 1999 (Majerus et al., 1999). Ces enzymes sont désignés comme étant des inositol polyphosphate 5-phosphatase (Inpp5) puisque leurs multiples substrats présentent plusieurs groupement phosphates. On connaît quatre substrats des 5-phosphatases, dont deux substrats lipidiques, le PI<sub>4</sub>,5P<sub>2</sub> et le PI<sub>3</sub>,4,5P<sub>3</sub>, et deux substrats solubles, l'inositol 1,3,4,5-tetraphosphate (Ins1,3,4,5P<sub>4</sub>) et l'inositol 1,4,5-triphosphate (Ins1,4,5P<sub>3</sub>). Toutes les Inpp5 contiennent les mêmes deux motifs catalytiques suivants : (F/I)WXGDXN(F/Y)R et (R/N)XP(S/A)(W/Y)(C/T)DR(I/V)(L/I) séparé de 60 à 75 acides aminés. On peut séparer les Inpp5 en quatre classes d'après la spécificité de leur substrat.

La classe I comprend une seule enzyme, l'inositol polyphosphate 5-phosphatase de type I (Inpp5a) ou 5-phosphatase I. Cette phosphatase hydrolyse seulement des substrats solubles, soient l'Ins1,3,4,5P<sub>4</sub> (IP<sub>4</sub>) et l'Ins1,4,5P<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>) (Laxminarayan et al., 1994). Ces deux inositols ont la particularité d'être impliqués directement dans la relâche du calcium dans le cytoplasme (voir section 1.2.1.3.). Des cellules transfectées avec un ADNc antisens de la 5-phosphatase I présentent des niveaux élevés de Ins1,4,5P<sub>3</sub> et de calcium intracellulaire, suggérant que les 5-phosphatases de type I contrôlent effectivement la signalisation par le calcium (Speed et al., 1996).

La classe des 5-phosphatases de type II inclue la 5-phosphatase de type II (Inpp5b) et OCRL1, deux enzymes identiques à 51% dans leur région catalytique sur plus de 744 acides aminés. *In vitro* ces enzymes hydrolysent les quatre substrats énumérés plus haut (Ross et al., 1991). Cependant, d'autres études ont démontré que le substrat majeur de OCLR1 est le PI<sub>4</sub>,5P<sub>2</sub> (Zhang et al., 1998). Le gène *OCRL* est situé sur le chromosome X et est muté chez les patients souffrant du syndrome de Lowe, aussi

appelé dystrophie oculo-cérébro-rénale (Attree et al., 1992). Cette maladie liée au chromosome X se caractérise par un retard mental, des cataractes congénitales et une dysfonction tubulorénale. La protéine OCRL1 est localisée au niveau du réseau *trans*-golgien (Suchy et al., 1995). De plus, les cellules rénales provenant de patients souffrant du syndrome de Lowe, ont des niveaux élevés de PI4,5P<sub>2</sub> et un défaut dans l'export des enzymes lysosomaux (Ungewickell and Majerus, 1999). Il est intéressant de noter que, chez la souris, l'ablation du gène *Ocrl1* ne cause aucun des défauts retrouvés chez les patients souffrant du syndrome de Lowe (Janne et al., 1998). Apparemment, contrairement à ce que l'on observe chez l'humain, *Inpp5b* et *Ocrl1* assurent des fonctions redondantes chez la souris, puisque la mutation d'un seul de ces gènes ne cause pas de phénotype, alors que le double mutant *Ocrl1*<sup>-/-</sup>*Inpp5b*<sup>-/-</sup> meurt très tôt *in utero*.

PIPP (proline-rich inositol polyphosphate 5-phosphatase ou Pip5pa) est aussi une phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 5-phosphatase, mais on a très peu d'informations sur cette protéine, excepté qu'elle peut être recruté dans les ondulations de membranes (ruffling) suite à une stimulation à l'EGF (Gurung et al., 2003).

Les 5-phosphatases de classes III hydrolysent seulement les substrats qui présentent un phosphate en position 3' de l'inositol, plus spécifiquement le PI3,4,5P<sub>3</sub> et l'Ins1,3,4,5P<sub>4</sub>. Cette classe inclut deux enzymes SHIP1 (aussi SHIP et *Inpp5d*) et SHIP2 (aussi *Inpp11*). SHIP1 et SHIP2 présentent toutes deux un domaine SH2 d'où elles tiennent leurs noms (SH2-containing inositol phosphatase) et partagent une grande similarité au niveau de leurs fonctions (Damen et al., 1996; Liu et al., 1997; Lamkin et al., 1997). Ces deux enzymes diffèrent cependant quant à leur patron d'expression tissulaire, SHIP1 étant majoritairement exprimée dans les tissus hématopoïétiques, alors que SHIP2 est exprimée dans la plupart des tissus. Comme les phosphatases SHIP déphosphorylent le PI3,4,5P<sub>3</sub> elles agissent de façon similaire à PTEN dans la cellule et sont des régulateurs négatifs de l'activation de la voie de

AKT (Aman et al., 1998). Les souris déficientes en SHIP1 sont viables à la naissance, mais développe rapidement un désordre myéloprolifératif. Ce défaut est causé par une activation trop importante de la voie PI3K/AKT en aval de multiples récepteurs à cytokines (Helgason et al., 1998). Les souris déficientes en SHIP2 (*Inpp1<sup>-/-</sup>*) présentent une résistance à l'obésité induite par une diète riche en gras. Ces souris sont également protégées de la résistance à l'insuline que provoque normalement une telle diète (Sleeman et al., 2005). Sleeman *et al.* montrent également que la voie de PI3K/AKT est activée de façon plus importante en réponse à l'insuline dans le foie et dans les muscles squelettiques des souris *Inpp1<sup>-/-</sup>* que dans les souris sauvages. Ces résultats sont en accord avec d'autres études qui impliquent SHIP2 dans le contrôle de la réponse à l'insuline en aval du récepteur à l'insuline (Clement et al., 2001; Wada et al., 2001).

Les 5-phosphatases de type IV forment une classe d'enzymes moins bien connues capables d'hydrolyser uniquement les substrats lipidiques incluant le PI4,5P<sub>2</sub>, le PI3,5P<sub>2</sub> et le PI3,4,5P<sub>3</sub>. Cette famille comporte deux enzymes SKIP et Inpp5e. SKIP (skeletal muscle and kidney enriched inositol phosphatase) hydrolyse le PI4,5P<sub>2</sub> et le PI3,4,5P<sub>3</sub> et est localisée au niveau du réticulum endoplasmique et de la membrane plasmique (Gurung et al., 2003). Inpp5e ou 5-phosphatase IV (cloné aussi sous le nom d'inositol polyphosphate 5-phosphatase de 72 kDa) hydrolyse le PI3,4,5P<sub>3</sub> et le PI3,5P<sub>2</sub> en position 5' et est localisée au niveau de l'appareil de Golgi (Kong et al., 2000).

#### **1.3.4.3. 4-phosphatases : Sac, Inpp4a et Inpp4b**

Il existe chez les mammifères deux familles de phosphatidylinositol 4-phosphatases, les enzymes présentant un domaine Sac homologue à la protéines Sac1p de levure et ceux de la famille Inpp4 qui n'ont pas d'homologue chez la levure et que l'on retrouve uniquement chez les métazoaires.

Parmi la famille des phosphatases à domaine Sac on retrouve hSac1, hSac2, hSac3, synaptojanine 1 et synaptojanine 2. Les 4-phosphatases à domaine Sac démontrent une spécificité de substrat moins importante que les enzymes de la famille Inpp4. hSac1 peut en effet déphosphoryler le PI4P et le PI3P *in vitro*, alors que la fonction des synaptojanines 1 et 2 est de déphosphoryler séquentiellement le PI4,5P<sub>2</sub> en position 4' et 5', générant du PI (Nemoto et al., 2000; Rohde et al., 2003; Guo et al., 1999). hSac1 est localisée à l'appareil de Golgi et au réticulum endoplasmique, suggérant que cette 4-phosphatase est responsable de la régulation du PI4P retrouvé au niveau de cette organelle. Les synaptojanines se retrouvent plutôt au niveau des vésicules enrobées de clathrines, là où les concentrations de leur substrat, le PI4,5P<sub>2</sub>, sont élevées. La synaptojanine 1 se retrouve plus spécifiquement dans les terminaisons nerveuses associée aux membranes enrobées de clathrines (Haffner et al., 1997). Les souris déficientes en synaptojanine 1 présentent des défauts neurologiques et des terminaisons nerveuses qui accumulent de façon anormale les vésicules enrobées de clathrines (Cremona et al., 1999).

Il existe deux inositol polyphosphate 4-phosphatases chez les mammifères, Inpp4a et Inpp4b, aussi appelé type I et type II, respectivement. Les inositol polyphosphate 4-phosphatases ont été purifiées à partir d'extraits de cerveau de rat, par le groupe de Philip W. Majerus au début des années 90. Ces enzymes ont la capacité de déphosphoryler en position 4' le PI3,4P<sub>2</sub> et deux analogues solubles de ce lipide l'inositol 3,4-biphosphate (Ins3,4P<sub>2</sub>) et l'inositol 1,3,4-triphosphate (Ins1,3,4P<sub>3</sub>) (Bansal et al., 1990; Norris and Majerus, 1994). Par la suite, des approches de purification protéique et de clonage moléculaire ont permis de caractériser les protéines Inpp4a et Inpp4b chez le rat et l'humain (Norris et al., 1995; Norris et al., 1997b). Ces deux phosphatases d'environ 105 kDa présentent 37% d'identité au niveau de leurs séquences protéiques. Inpp4a et Inpp4b présentent toutes deux, dans leur partie C-terminale, une séquence CKSAKDR, un motif retrouvé dans le site actif de plusieurs phosphatases (Zhang and Dixon, 1994). Une étude subséquente de la

séquence protéique de Inpp4a a permis de mettre en évidence la présence de deux domaines C2 en tandem en N-terminale (Ivetac et al., 2005). Aucun autre motif n'a été décrit comme étant présent dans Inpp4a ou Inpp4b.

Une hybridation de type Northern sur des ARN provenant de tissus de rat montre que Inpp4a est exprimée dans tous les tissus testés et plus fortement au niveau du cerveau, du coeur et du muscle squelettique (Norris et al., 1995). L'expression d'Inpp4b a quant à elle été vérifiée sur des tissus humains. Une forte expression de l'ARN messager est détectée dans le coeur, le muscle et le cerveau (Norris et al., 1997b). Tant Inpp4a que Inpp4b sont exprimées sous plusieurs formes de messagers, suggérant qu'il existe différentes isoformes de ces enzymes.

Les travaux de Norris *et al.* ont permis d'identifier deux des isoformes d'Inpp4a conservés chez Inpp4b. Ces isoformes, nommés alpha et beta, résultent d'un épissage alternatif du dernier exon (exon 24 et 25) qui modifie la portion C-terminale de la protéine. Ainsi dans Inpp4a $\alpha$  et Inpp4b $\alpha$  le C-terminal est hydrophile, alors que dans Inpp4a $\beta$  et Inpp4b $\beta$  cette partie de la protéine présente un domaine hydrophobe potentiellement membranaire (Norris et al., 1997b). Deux autres isoformes d'INPP4A ont été identifiés plus récemment dans les plaquettes humaines, INPP4A $\alpha_2$  et INPP4A $\alpha_3$  (Shearn et al., 2001). Dans INPP4A $\alpha_2$  l'exon 16 du gène *INPP4A* n'est pas inclus, ce qui résulte en l'absence d'une séquence de 33 paires de bases dans le messager et de 11 acides aminés dans la protéine. INPP4A $\alpha_3$  résulte de l'utilisation d'un site d'épissage donneur alternatif dans l'intron 15 et de l'inclusion dans le messager de 120 pb en aval de l'exon 15 d'*INPP4A*. INPP4A $\alpha_3$  présente ainsi une insertion de 40 acides aminés. Le rôle joué par ces deux épissages alternatifs dans la fonction d'INPP4A $\alpha$  n'a pas encore été étudié. De même, la fonction des isoformes potentiellement membranaires Inpp4a $\beta$  et Inpp4b $\beta$  demeure spéculative.

L'une des caractéristiques d'Inpp4a et d'Inpp4b est la présence de séquences PEST dans la partie centrale de la protéine (Norris et al., 1997a). Les séquences PEST sont des motifs riches en proline, en acide glutamique et aspartique, en serine et en thréonine, que l'on retrouve dans les protéines soumises à la protéolyse par la protéase calpaïne (Rechsteiner and Rogers, 1996). Une étude suggère que INPP4A serait clivée par la calpaïne dans les plaquettes humaines suite à une stimulation à la thrombine. Cette protéolyse est accompagnée d'une réduction de l'activité 4-phosphatase dans les plaquettes (Norris et al., 1997a). Il est intéressant de constater que certaines des séquences PEST présentes dans INPP4A $\alpha_1$  sont modifiées dans les isoformes INPP4A $\alpha_2$  et INPP4A $\alpha_3$  (Shearn et al., 2001).

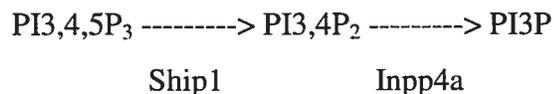
Une autre étude a montré que INPP4A $\alpha$  forme un complexe avec la sous-unité régulatrice p85 de la PI3 kinase dans le cytoplasme des plaquettes (Munday et al., 1999). Ce complexe est partiellement recruté au cytosquelette d'actine suite à une stimulation à la thrombine. Cette association permettrait de localiser INPP4A $\alpha$  au site de production de PI3,4P<sub>2</sub>. Ce type d'association entre la sous-unité régulatrice p85 et une inositol phosphatase avait déjà été montré pour une 5-phosphatase (Liu et al., 1996).

Des travaux du groupe de S.H. Orkin ont montré que l'expression de Inpp4a était réduite dans les mégacaryocytes déficients en GATA-1, un facteur de transcription à doigts de zinc impliqués dans l'hématopoïèse (Vyas et al., 2000). Les mégacaryocytes *Gata-1*<sup>-/-</sup> hémizygotés (*Gata1* est localisé sur le chromosome X) présentent un défaut dans leur maturation et prolifèrent de façon incontrôlée (Shivdasani et al., 1997). La réexpression de Inpp4a dans ces cellules réduit considérablement leur prolifération, suggérant que la sous-expression d'Inpp4a dans les mégacaryocytes *Gata-1*<sup>-/-</sup> est en partie responsable du phénotype d'hyperprolifération. Inpp4a a également un effet anti-prolifératif sur les fibroblastes NIH 3T3 en culture (Vyas et al., 2000). Ces résultats suggèrent que Inpp4a pourrait être un régulateur négatif de la prolifération cellulaire.

À ce jour, aucune ablation génique ciblée n'a été décrite pour les gènes *Inpp4a* ou *Inpp4b* chez la souris (voir chapitre 5). Cependant, une mutation spontanée dans *Inpp4a* a été décrite chez la souris *weeble* (*wbl*). Cette mutation récessive consiste en une délétion d'une paire de base dans l'exon 10 d'*Inpp4a* qui résulte en un changement du cadre de lecture du messenger et l'apparition d'un codon non-sens (stop) à l'acide aminé 263 (Nystuen et al., 2001). De façon intéressante, la présence de ce codon non-sens est associée avec l'absence complète de messenger codant pour *Inpp4a* chez la souris *wbl*, suggérant qu'un mécanisme de « nonsense-mediated decay » (NMD) est responsable de la dégradation du messenger. On peut donc considérer que l'allèle *wbl* est un allèle nulle d'*Inpp4a*. Les souris homozygotes pour la mutation *wbl* présentent un phénotype d'instabilité locomotrice et d'ataxie dès l'âge de 2 semaines et meurent généralement avant 3 semaines. Ce défaut semble causé par une perte post-natale de plusieurs populations de neurones dans le cervelet et dans le champs CA1 de l'hippocampe. Les cellules de Purkinje sont particulièrement touchées dès le jour 6 post-natal. Cette disparition progressive des neurones est associée à une mort cellulaire par apoptose plus importante dans le cervelet et l'hippocampe des souris *wbl*. Des hybridations *in situ* ont permis de montrer que *Inpp4a* était exprimé fortement dans les cellules de Purkinje, mais également dans l'hippocampe et le reste de l'encéphale. L'ensemble de ces résultats suggère un rôle important pour *Inpp4a* dans la survie des neurones après la naissance. Le mécanisme moléculaire par lequel cette enzyme est impliquée dans ce processus reste cependant à être découvert.

Des indices expérimentaux suggèrent également un rôle pour *Inpp4a $\alpha$*  dans la production de PI3P à la surface des endosomes. Une étude très récente démontre que dans les cellules COS-1, *Inpp4a $\alpha$*  est localisé principalement à la surface des endosomes (Ivetac et al., 2005). La stimulation des cellules avec le facteur de croissance EGF induit cependant le recrutement de *Inpp4a $\alpha$*  à la membrane plasmique. La localisation aux endosomes dépend des deux domaines C2 en tandem

qui sont capables de lier *in vitro* de façon plus ou moins spécifique le PI4P, le PI3,4P<sub>2</sub> et la phosphatidylsérine. La localisation membranaire de Inpp4aα suite à une stimulation à l'EGF dépendrait plutôt des domaines central et catalytique de la protéine. Cette étude suggère finalement que l'activité d'Inpp4aα serait à la surface des endosomes et participerait à la production de PI3P, le produit de cette enzyme, et à la membrane plasmique afin de réduire la quantité de PI3,4P<sub>2</sub>, son substrat. Un rôle pour Inpp4aα dans la production de PI3P à la surface des endosomes est appuyé par une autre étude qui a montré que Inpp4a et Ship1 étaient requis afin de permettre la production de PI3P à partir de PI3,4,5P<sub>3</sub> selon les réactions séquentielles suivantes :



Cette production de PI3P serait essentielle au recrutement de p40<sup>phox</sup>, à l'activation de la NADPH oxydase et à la production de ROS (Ellson et al., 2001). Le recrutement de la NADPH oxydase se produit au cours de la phagocytose et de la fusion des phagosomes avec les endosomes précoces. La localisation de Inpp4aα à la surface des endosomes, une fonction enzymatique dans la production de PI3P et un rôle dans l'activation de la NADPH oxydase sont donc des observations concordantes.

Deux autres protéines chez l'humain, P-Rex1 et P-Rex2, contiennent un domaine 4-phosphatase moins bien conservé en N-terminal (Welch et al., 2002; Donald et al., 2004; Rosenfeldt et al., 2004). Les protéines de la famille P-Rex sont des facteurs d'échanges de guanines (GEF) pour Rac et sont activées par le PI3,4,5P<sub>3</sub> et par les récepteurs à protéines G hétérotrimériques. Le domaine 4-phosphatase présent dans P-Rex1 et P-Rex2 est seulement identique à 26% avec celui d'Inpp4b au niveau de la séquence en acides aminés. Cependant, les résidus cystéine et arginine du site actif (CXXXXXR) sont conservés chez P-Rex1 et P-Rex2, suggérant que ce domaine est enzymatiquement fonctionnel. Welch *et al.* ne sont pas parvenu à observer d'activité 4-phosphatase pour P-Rex1 lorsqu'ils l'ont testé sur du PI3,4,5P<sub>3</sub> et du PI3,4P<sub>2</sub>. Ce

résultat suggère deux conclusions : 1) au cours de l'évolution le domaine 4-phosphatase de P-Rex1 et P-Rex2 sont devenus inactif. Ce domaine pourrait avoir d'autres fonctions, comme celui de lier les phosphoinositides; 2) le domaine 4-phosphatase des protéines P-Rex est toujours actif enzymatiquement, mais sa spécificité a évolué et ces phosphatases pourraient maintenant avoir une préférence pour d'autres substrats. Cette deuxième hypothèse demeure plausible, d'autant plus que l'activité phosphatase des protéines P-Rex n'a pas été testée sur tous les phosphoinositides. Il est possible également que les domaines 4-phosphatase de P-Rex1 et P-Rex2 aient évolué afin de déphosphoryler des substrats non-lipidiques comme des phosphoprotéines.

Nous venons de voir qu'il existe un nombre limité d'informations sur la fonction de Inpp4a dans les cellules. Il reste donc à réconcilier les observations faites *in vitro* avec les phénotypes observés *in vivo* chez la souris *weeble*. D'autre part, aucune étude n'a été publiée concernant la fonction biologique d'Inpp4b. Il reste donc beaucoup à faire concernant l'étude des inositol polyphosphate 4-phosphatases.

Cependant, les résultats présentés dans cette thèse permettent de suggérer un nouveau rôle pour Inpp4b dans la différenciation, l'activité des ostéoclastes et l'homéostasie osseuse (voir Chapitre 2). Mes travaux m'ont permis également d'identifier et de caractériser le gène *Inpp4b* chez la souris, d'étudier la localisation subcellulaire des isoformes Inpp4b $\alpha$  et Inpp4b $\beta$  et de cloner un nouvel isoforme d'Inpp4b, Inpp4b $\delta$  (voir Chapitre 3). Finalement, j'ai pu développer des outils génétiques permettant l'ablation conditionnelle d'Inpp4b chez la souris afin de mieux comprendre son rôle *in vivo* (voir Chapitre 4 et 5).

Jusqu'à présent cette section nous a permis de voir de façon générale la synthèse, la dégradation et la fonction des phosphoinositides. J'aborderai, avant de clore cette partie, les différents rôles joués par les phosphoinositides dans le métabolisme osseux et plus particulièrement dans la différenciation et la fonction des ostéoclastes.

### **1.3.5. Rôles des PI3 kinases, des phosphatidylinositol phosphatases et des phosphoinositides dans le métabolisme osseux**

Un nombre toujours croissant d'études montre que la PI3 kinase est impliquée dans plusieurs processus au niveau de l'ostéoclaste. J'ai déjà expliqué comment la PI3K était activée en aval de RANK et comment son activité était importante pour la survie et la différenciation des ostéoclastes (voir section 1.2.2.2.4.). Nous avons également vu que, dans les ostéoclastes, la PI3K était aussi activée suite à la liaison du facteur M-CSF son récepteur c-fms (voir section 1.2.1.1.). D'autres preuves de l'importance des phosphoinositides dans la maturation et l'activité de ces cellules seront présentées dans cette section.

La PI3K et les phosphoinositides en général sont également impliqués dans l'activité de résorption de l'ostéoclaste. D'abord, des études plus ou moins récentes montrent que les inhibiteurs de la PI3K, LY294002 et wortmannin, bloquent la formation de la bordure plissée, de l'anneau d'actine et la résorption dans des ostéoclastes matures (Lee et al., 2002a; Nakamura et al., 1995). Dans ce cas l'action de la PI3K se situerait en aval de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , impliquée dans l'attachement à la matrice osseuse, dans la polarisation de l'ostéoclaste et dans la formation des podosomes (voir section 1.2.3.1.). La formation des podosomes et la motilité de l'ostéoclaste serait induite par le recrutement de la gelsoline à la membrane via sa liaison au PI4,5P<sub>2</sub>, au PI3,4P<sub>2</sub> et au PI3,4,5P<sub>3</sub>. Ce recrutement empêcherait la gelsoline de lier les extrémités des filaments d'actine, permettant ainsi une réorganisation du cytosquelette (Chellaiah et al., 1998). Les ostéoclastes déficients en gelsoline sont hypomotiles et présentent un nombre réduit de podosomes. Donc, bien que la gelsoline soit un inhibiteur de la polymérisation d'actine, son absence bloque également la formation des podosomes. Cette observation illustre bien que la motilité cellulaire implique des processus de

remodelage constant du cytosquelette et qu'un équilibre entre activateurs et inhibiteurs est requis et essentiel.

Nous avons vu dans la section 1.3.2.1. qu'il existait plusieurs classes de PI3K. Bien que l'on sache que l'activité PI3K en général est importante dans les ostéoclastes, très peu d'informations sont disponibles concernant quelles classes et sous-unité de PI3K sont spécifiquement impliquées dans les processus de différenciation et d'activation de l'ostéoclaste.

Au niveau génétique, des ablations géniques de certaines PI3K de classe I sont disponibles. L'inactivation des gènes *Pik3ca* ou *Pik3cb* qui codent pour les sous-unités catalytiques p110 $\alpha$  et p110 $\beta$ , cause une mort embryonnaire, empêchant l'analyse d'éventuels phénotypes osseux chez ces souris (Bi et al., 1999; Bi et al., 2002). La déficience en p110 $\gamma$  est viable chez la souris, mais provoque des défauts dans la prolifération et la fonction des lymphocyte T et une réduction dans la migration des neutrophiles (Sasaki et al., 2000). Considérant ces défauts hématopoïétiques, il serait intéressant de vérifier la fonction et la différenciation des ostéoclastes déficients en p110 $\gamma$ . La même observation s'applique à un mutant kinase inactif de p110 $\delta$  qui présente des défauts dans les fonctions des cellules T et B (Okkenhaug et al., 2002).

Concernant les sous-unités régulatrices, seule l'ablation du gène p85 $\alpha$  a été réalisée. Deux types de délétions ont permis, soit d'inactiver seulement p85 $\alpha$ , soit d'inactiver p85 $\alpha$ , p55 $\alpha$  et p50 $\alpha$ . L'inactivation simultanée des trois types de sous-unités régulatrices provoque une dégénération du foie et une mort périnatale (Fruman et al., 1999; Fruman et al., 2000). L'inactivation de p85 $\alpha$  uniquement est viable, mais affecte la maturation des cellules B et augmente la réponse à l'insuline provoquant une hypoglycémie (Ueki et al., 2002; Suzuki et al., 1999). Encore une fois,

l'implication de p85 $\alpha$  dans l'hématopoïèse suggère un rôle potentiel dans l'ostéoclastogenèse, mais aucun phénotype osseux n'a été rapporté pour ces souris.

Le rôle précis joué par les différentes classes de PI3K dans les ostéoclastes reste donc à être élucidé. Une étude exhaustive de l'expression des différentes sous-unités de PI3K au niveau des ostéoclastes permettrait d'orienter les études futures.

En ce qui concerne le rôle des inositol phosphatases, des travaux récents, *in vitro* et *in vivo*, confirment l'implication de PTEN et SHIP1 dans la différenciation et l'activité des ostéoclastes.

Une étude faisant appel à la lignée cellulaire préostéoclastique RAW 264.7 démontre que PTEN est un régulateur négatif de la réponse au RANKL (Sugatani et al., 2003). Nous avons vu plus haut que PTEN agit négativement sur les signaux induits par la PI3K en déphosphorylant l'un des produits majeurs de cette kinase, le PI3,4,5P<sub>3</sub>. La surexpression de PTEN dans les RAW bloque la différenciation induite par RANKL et l'activation de AKT, l'une des cibles importantes de la PI3K. Cette inhibition de la différenciation résulterait surtout d'une réduction dans la survie des cellules qui est normalement favorisée par AKT via son activité anti-apoptotique. La surexpression de PTEN bloque également la migration cellulaire induite par l'ostéopontine, un ligand de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , qui est activé normalement par une voie PI3K/AKT/Rac dans les cellules RAW. Ces résultats suggèrent que PTEN est un régulateur négatif important dans les ostéoclastes en aval de RANK et de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . L'ablation génique de *Pten* chez la souris cause une mort embryonnaire précoce. Il serait donc intéressant de faire appel à une approche d'ablation génique conditionnelle de *Pten* dans les ostéoclastes afin de confirmer ces résultats *in vivo*. Des allèles floxés de *Pten* ont d'ailleurs déjà été générées (Kwon et al., 2001).

Nous avons vu plus haut que SHIP1 était exprimée presque exclusivement dans le système hématopoïétique, incluant les monocytes et les préostéoclastes (Liu et al.,

1998). Une étude du squelette des souris *Ship*<sup>-/-</sup> a révélé qu'elles souffraient d'une ostéoporose très sévère, dès l'âge de 8 semaines (Takeshita et al., 2002). Un nombre accru d'ostéoclastes est observé *in vivo* dans ces animaux. Ces ostéoclastes sont individuellement plus gros et plus actifs dans des essais de résorption. Une sensibilité augmentée au M-CSF et au RANKL serait responsable de ce phénotype selon les auteurs de cette étude qui n'ont pourtant pas vérifié l'activation des cibles de la PI3K, et plus particulièrement AKT, dans les ostéoclastes *Ship*<sup>-/-</sup>.

L'implication de PTEN et de SHIP dans la réponse au RANKL et l'activité de résorption des ostéoclastes, suggère que d'autres phosphatidylinositol phosphatases sont également être impliquées dans ces processus. Les résultats présentés dans cette thèse montrent que *Inpp4b*, une phosphatidylinositol 4-phosphatase, est un régulateur négatif de la différenciation des ostéoclastes et que son activité est également importante dans les remaniements du cytosquelette en association avec la formation des podosomes.

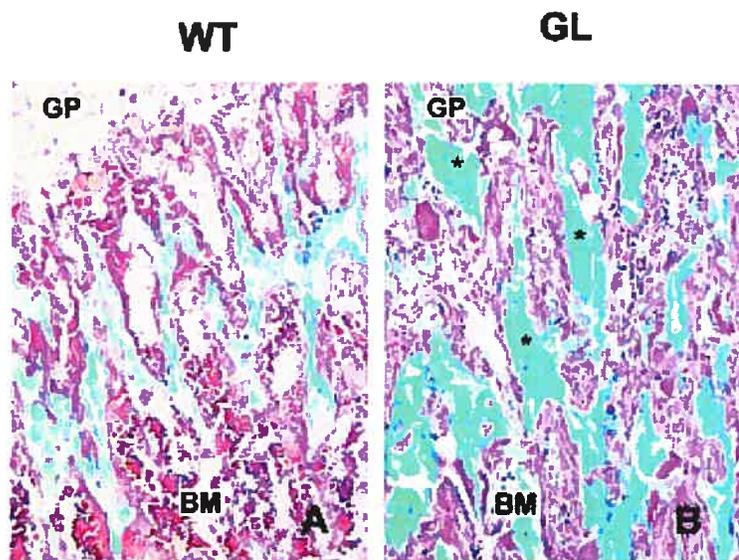
#### 1.4. LA SOURIS GREY-LETHAL ET LA PROTÉINE OSTM1

Nous avons vu qu'il existe de nombreuses mutations associées à un phénotype ostéopétrotique chez la souris (voir section 1.2.). Parmi ces modèles murins, la souris *grey-lethal* (*gl*) est l'un de ceux qui ressemble le plus à la forme sévère de l'ostéopétrose autosomale-récessive (ARO) chez l'humain.

L'ostéopétrose chez la souris homozygote *gl/gl* est complètement pénétrante et la mort survient à 3 ou 4 semaines après la naissance chez ces animaux (Gruneberg, 1935). Comme c'est le cas chez les malades souffrant d'ARO, le phénotype *gl/gl* peut-être corrigé par un transfert de moelle osseuse, indiquant un défaut intrinsèque aux ostéoclastes ou à leurs précurseurs (Walker, 1975; Eapen et al., 1998). La souris *gl/gl* présente deux phénotypes apparents, une ostéopétrose sévère et un défaut de pigmentation.

L'ostéopétrose *gl* se manifeste par une absence d'éruption des dents, plus particulièrement des incisives, due à une absence d'activité des ostéoclastes au niveau des l'os des mâchoires. Au niveau histologique, la métaphyse des fémurs *gl/gl* présente une réduction drastique de la cavité médullaire qui est plutôt occupée par une quantité anormalement élevée d'os trabéculaire calcifié (voir figure 1-23). L'os cortical est également mal développé et la plaque de croissance est plus mince chez les souris *gl/gl*. Des analyses histomorphométriques révèlent que la densité osseuse est augmentée d'au moins trois fois en comparaison avec des souris sauvages. *In vitro* et *in vivo* le nombre d'ostéoclastes multinucléés chez les souris *gl/gl* est augmenté d'environ 40% par rapport aux contrôles, suggérant que la différenciation n'est pas affectée par la perte du gène *gl* et qu'un mécanisme compensatoire entre en jeu afin d'augmenter le nombre d'ostéoclastes matures. Ces ostéoclastes sont cependant incapables de résorber la dentine *in vitro*. Une analyse par microscopie électronique des ostéoclastes présents dans l'os révèle que les ostéoclastes *gl/gl* sont attachés à la matrice osseuse, mais présentent une bordure plissée sous développée (figure 1-24).

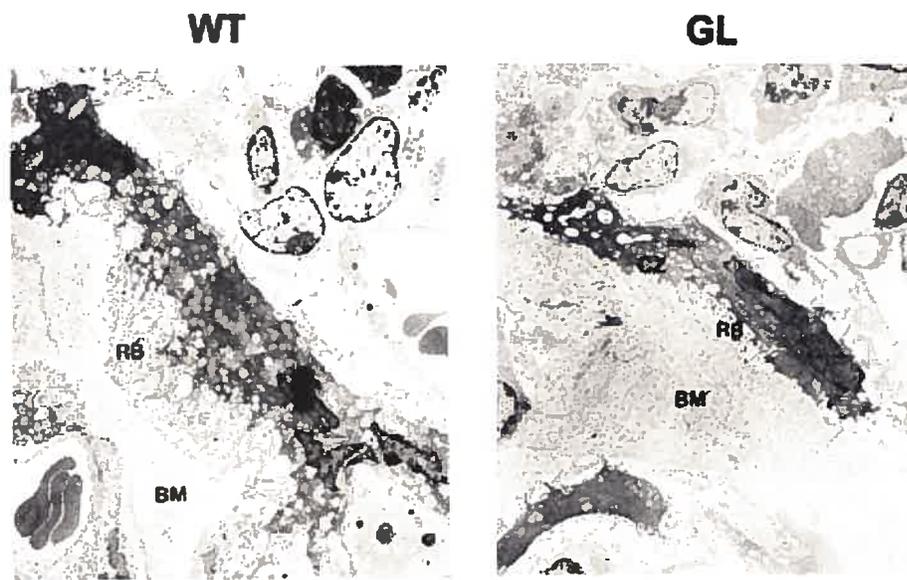
plissée sous développée (figure 1-24). Des analyses par immunofluorescence sur des ostéoclastes générés *in vitro* à partir de splénocytes (OCLs) démontre clairement un défaut de formation de l'anneau d'actine et des podosomes, et une mauvaise localisation de la pompe à protons en absence de *gl* (figure 1-25). L'ensemble de ces résultats suggère que la mutation *gl* induit un défaut dans l'activation et/ou la résorption dans les ostéoclastes et exclut majoritairement l'implication du gène *gl* dans la différenciation de ces cellules.



**Figure 1-23. Augmentation de la densité osseuse chez la souris *gl/gl*.**

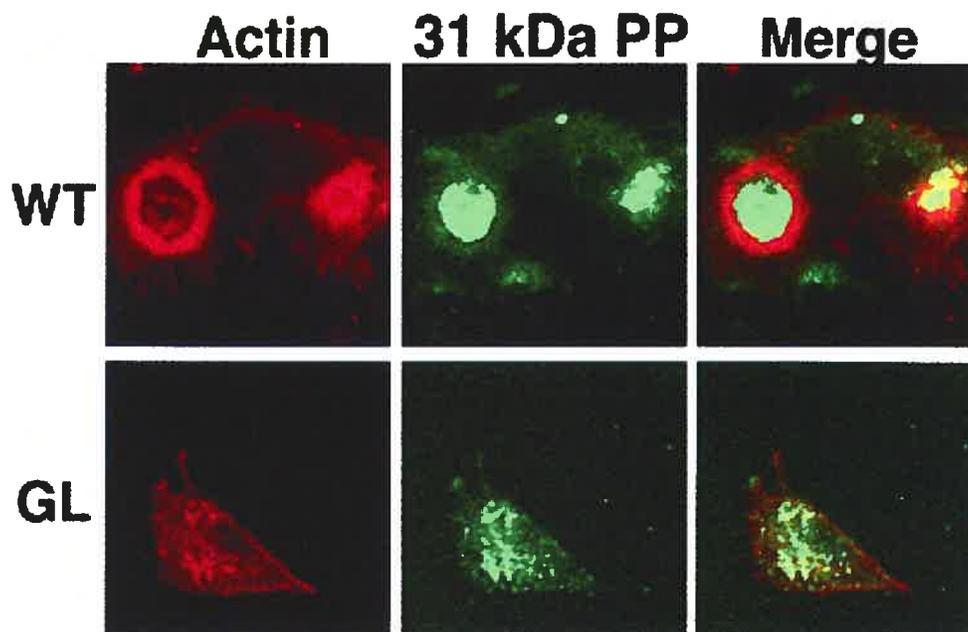
Coloration Masson-Goldner du fémur d'une souris contrôle et *gl/gl* (GL). Une réduction importante de l'espace occupé par la moelle osseuse (BM) est observé chez GL. Une accumulation d'os trabéculaire calcifié (en vert) est également observée (étoile) (Rajapurohitam et al., 2001).

La souris *gl/gl* présente aussi un défaut de pigmentation qui se manifeste par une coloration grise du pelage plutôt qu'agouti. Ce phénotype, encore mal compris, serait provoqué par une accumulation des granules de phéomélanine dans les mélanocytes (Gruneberg, 1935).



**Figure 1-24. Analyse ultrastructurale des ostéoclastes *gl/gl*.**

Micrographies électroniques d'un fémur contrôle (WT) et *gl/gl* (GL). L'ostéoclaste *gl/gl* présente une bordure plissée sous-développée. CZ, zone claire. RB, bordure plissée. BM, matrice osseuse (Rajapurohitam et al., 2001).



**Figure 1-25. Immunofluorescence sur des ostéoclastes contrôles et *gl/gl* placés sur de la dentine.**

La localisation de l'actine (rouge) et de la sous-unité de 31 kDa de la pompe à proton (vert) a été étudiée (Rajapurohitam et al., 2001).

L'identification de la mutation et du gène *gl* a été réalisée récemment par notre équipe. Une approche de clonage positionnel a d'abord permis de définir la région génétique, puis physique contenant la mutation *gl* sur le chromosome 10 (Vacher and Bernard, 1999; Chalhoub et al., 2001). Une complémentation par transgénèse à l'aide de chromosomes artificiels de bactérie (BAC) à ensuite menée à l'identification d'un gène candidat d'environ 23 kb et comportant 6 exons. Une délétion d'environ 7,5 kb couvrant la région 5' et l'exon 1 de ce gène a été identifiée dans l'ADN de la souris *gl* (Chalhoub et al., 2003). Cette délétion est responsable de l'absence d'expression de ce gène chez les souris *gl/gl*.

*gl* est exprimé sous la forme d'un messager unique d'environ 3 kb qui est détecté dans la plupart des tissus et plus fortement dans le thymus, le testicule, le rein et la rate. L'expression de *gl* est également importante au niveau des ostéoclastes, des ostéoblastes et des mélanocytes. Des études d'hybridation *in situ* confirment l'expression relativement ubiquiste de *gl* (Chalhoub et al., 2003). En fait, les études effectuées dans notre laboratoire par la suite ont permis de démontrer que le messager de *gl* est détecté à des niveaux variables, mais toujours détectables, dans tous les tissus et les types cellulaires que nous avons testés jusqu'à présent, incluant les cellules souches embryonnaires.

Par la suite, deux mutations dans le gène humain *GL* ont été identifiées chez des patients souffrant d'ARO, confirmant l'implication de ce gène dans l'ostéopétrose humaine (Chalhoub et al., 2003; Ramirez et al., 2004). Une troisième mutation vient d'être identifiée dans notre laboratoire (Pata M *et al.* résultats non publiés), ce qui fait de *GL* le troisième gène en importance dans les cas d'ARO (voir section 1.2.3.2.).

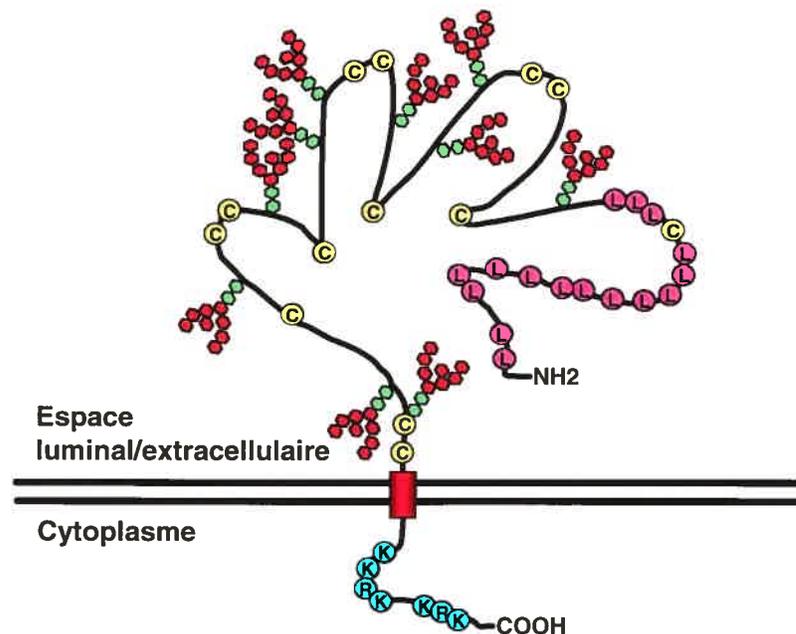
Le gène *gl* code pour une protéine unique de 338 acides aminés chez la souris. Ce gène est conservé chez l'humain et les vertébrés en général, chez *D. melanogaster* et chez *C. elegans*, mais pas chez la levure. En se basant sur sa structure, la protéine

codée par le gène *gl* a été appelée Ostm1 (osteopetrosis transmembrane protein 1). Une analyse bioinformatique révèle que Ostm1 comporte un peptide signal en N-terminal et un domaine transmembranaire près de sa partie C-terminale (figure 1-26). Ostm1 est donc probablement une protéine transmembranaire de type I, présentant un domaine extracellulaire ou luminal d'environ 250 acides aminés, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique de 30 acides aminés.

```

1  MEPGPTAAQRRCSLPPWLPLGLLLWSGLALGALPFGSSPHRVFHDLLSEQ
51  QLLIEVEDLSLSLIQGGGLGPISLPPDIPDIDPECRELLIDFANSSAELTG
101 CLVRSARPVRLCQTCYPLFQQVVKMDNISRAAGNTSESQSCARSLLMAD
151 RMQIVVILSEFFNTTWQEANCANCLTNNSEELSNSTVYFLNLFNHTLTCF
201 EHNLQGNAHSLLOTKNYSEVCKNCREAYKTLSSLYSEMQKMNLENKAEP
251 GTHLCIDVEDAMNITRKLWSRTFNCSVPCSDTVPVIAVSVFILFLPVVVFY
301 LSSFLHSEQKRLILPKRLSSTSFANIQENSN

```



**Figure 1-26. Séquence (en haut) et modèle (en bas) de la protéine OSTM1.**

Les différentes caractéristiques de la séquence protéique humaine sont indiquées en haut et schématiquement représentées en bas : le peptide signal est souligné, les 16 leucines de la région riche en leucine sont surlignées en violet, les 13 cystéines conservées sont surlignées en jaune, les 10 sites potentiels de N-glycosylation sont surlignés en rouge, le domaine transmembranaire potentiel est en gras et les arginines et les lysines de la région basique en N-terminale sont surlignées en bleu.

L'analyse plus attentive de la séquence protéique d'Ostm1 montre que la partie luminale/extracellulaire présente un motif unique de 13 cystéines qui sont très conservées à travers l'évolution. La queue N-terminale présente également une région riche en leucines (16 leucines dans une région de 44 acides aminés). La partie luminale présente aussi 10 sites potentiels de N-glycosylation. Des études menées dans notre laboratoire suggèrent que tous ces sites seraient effectivement glycosylés, faisant passer la taille prédite d'Ostm1 de 38 kDa à une taille observée de plus de 60 kDa (Beauregard J *et al.* résultats non publiés). Ces mêmes travaux, effectués dans les cellules COS, suggèrent qu'Ostm1 est une protéine résidente du réticulum endoplasmique. Finalement, la partie C-terminale et cytoplasmique d'Ostm1 présente un motif basique, KKRKXXXKRXX, qui pourrait être impliqué dans des interactions avec d'autres protéines.

La protéine Ostm1 présente des caractéristiques et une localisation cellulaire qui suggère un rôle dans les voies de sécrétion. Ce rôle possible est en accord avec les phénotypes observés chez la souris *gl/gl*, c'est à dire un défaut de formation de la bordure plissée dans les ostéoclastes et un défaut de transport des pigments dans les mélanocytes. Il reste encore à définir la fonction exacte d'Ostm1 dans la cellule. Des approches permettant d'identifier des partenaires protéiques ou des ligands permettront d'obtenir des indices supplémentaires sur cette fonction.

## 1.5. HYPOTHÈSE

L'objectif initial de mon projet de doctorat était d'identifier des gènes dont l'expression serait modifiée en présence de la mutation ostéopérotique *grey-lethal*. Afin d'y parvenir, j'ai fait appel à une approche alternative consistant à étudier l'expression différentielle des gènes dans les préostéoclastes *gl/gl* et sauvages. Cette étude m'a permis de mettre en évidence que l'inositol polyphosphate 4-phosphatase de type II (*Inpp4b*) présente une expression réduite dans les ostéoclastes *gl/gl*.

Considérant le rôle important que semble jouer la PI3 kinase et les phosphoinositides dans la différenciation et l'activité des ostéoclastes, j'ai décidé d'étudier plus en détail la fonction d'*Inpp4b* dans ces cellules. J'ai fait appel à un modèle cellulaire, les cellules RAW 264.7, ainsi qu'à une étude de souris transgéniques (Chapitre 2).

D'autre part, j'ai voulu caractériser le gène et la protéine *Inpp4b* chez la souris, des travaux qui n'avaient pas encore été réalisés. J'ai notamment étudié l'expression tissulaire des différents isoformes d'*Inpp4b* et de l'orthologue *Inpp4a*, identifié le promoteur d'*Inpp4b* et cloné un nouvel isoforme d'*Inpp4b*, *Inpp4bas* (Chapitre 3). Cette étude était importante afin de réaliser l'ablation génique (knockout) d'*Inpp4b* chez la souris pour définir les fonctions *in vivo* de la protéine.

L'expression relativement ubiquiste d'*Inpp4b* a justifié le choix du système Cre/lox, permettant l'ablation génique conditionnelle. En effet, parallèlement à mes travaux *in vitro*, j'ai généré deux outils indispensables afin de déterminer le rôle d'*Inpp4b* *in vivo*. D'une part une souris présentant un allèle floxé d'*Inpp4b* (Chapitre 5), d'autre part une souris exprimant la recombinaison Cre dans les ostéoclastes et leurs précurseurs (Chapitre 4).

**CHAPITRE 2. L'INOSITOL POLYPHOSPHATE 4-PHOSPHATASE DE  
TYPE II, UN GÈNE SOUS-EXPRIMÉ CHEZ LA SOURIS  
OSTÉOPÉTROTIQUE GREY-LETHAL, RÉGULE LA RÉPONSE AU  
RANKL ET LA RÉSORPTION DANS LES OSTÉOCLASTES**

## 2.1. MISE EN SITUATION.

La souris grey-lethal (*gl*) est caractérisée par un phénotype ostéopétritique sévère causé par une mutation dans le gène *Ostm1*. La fonction de la protéine *Ostm1* n'est pas encore définie. Par contre, les ostéoclastes *gl/gl* présentent des défauts dans la formation de l'anneau d'actine et de la bordure plissée. Bien qu'ils aient une capacité de résorption réduite, les ostéoclastes *gl/gl* sont présents en plus grand nombre dans les os et se différencient plus vite *in vitro*, suggérant que ces cellules font appel à un mécanisme compensatoire intrinsèque. L'objectif initial de l'étude présentée dans cet article était de trouver des gènes dont l'expression est affectée dans les ostéoclastes *gl/gl*. Afin d'identifier ces gènes nous avons procédé à une étude de « differential display ». Parmi les transcrits ainsi identifiés, je me suis intéressé plus particulièrement au gène codant pour l'inositol polyphosphate 4-phosphatase de type II (*Inpp4b*) dont l'expression est réduite dans les os et les ostéoclastes *gl/gl* comparativement aux cellules contrôles. *Inpp4b* déphosphoryle en position 4' le  $PI3,4P_2$  et deux analogues solubles de ce lipide l'inositol 3,4-biphosphate ( $Ins3,4P_2$ ) et l'inositol 1,3,4-triphosphate ( $Ins1,3,4P_3$ ). Considérant l'importance de la signalisation par la PI3K dans l'ostéoclastogenèse, le deuxième objectif de cet article était d'étudier les rôles potentiels d'*Inpp4b* dans la différenciation et l'activité des ostéoclastes. Par des études *in vitro* faisant appel aux cellules RAW 264.7, un modèle de préostéoclastes, j'ai pu suggérer un rôle pour *Inpp4b* dans le contrôle de la différenciation des ostéoclastes en réponse au RANKL, ainsi que dans l'activation de l'ostéoclaste en association avec la formation des podosomes. Un troisième objectif de cette étude était de vérifier le rôle *in vivo* joué par *Inpp4b* dans le phénotype *gl*.

## 2.2. ARTICLE 1.

### DUAL FUNCTION OF THE INOSITOL POLYPHOSPHATE 4-PHOSPHATASE TYPE II IN OSTEOCLAST DIFFERENTIATION AND ACTIVATION

MATHIEU FERRON\*, MONICA PATA and JEAN VACHER\*<sup>&#</sup>

Institut de recherches cliniques de Montréal, \*Programme de biologie moléculaire de la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal, <sup>&</sup>Faculté de Médecine de l'Université de Montréal.

<sup>#</sup> : Corresponding author

████████████████████

████████████████

En préparation, sera soumis à *Journal of Clinical Investigation*.

Contribution des auteurs :

Mathieu Ferron : Ensemble de l'étude et rédaction du manuscrit sous la supervision du Dr Jean Vacher.

Monica Pata : Préparation de la culture d'ostéoclaste et du RT-PCR présenté à la Figure 2-1 E. Immunofluorescences sur les ostéoclastes primaires présentées à la Figure 2-5 G-L. Soutient technique générale.

Jean Vacher : Supervision scientifique, gestion des croisements de souris et rédaction du manuscrit.

## ABSTRACT

Etiology of osteopetrosis is multifactorial but this genetic disease is constantly characterized by an abnormal accumulation of bone tissue resulting from inefficient osteoclastic bone resorption. Here we used the osteopetrosis mouse grey-lethal mutation (*gl* or *Osmt1*) in a differential display screen, to compare skeletal gene expression in the mutant versus unaffected littermates. One of the several detected down-regulated transcripts corresponds to the murine homologue of inositol polyphosphate 4-phosphatase type II (*Inpp4b*). Expression analysis confirmed that *Inpp4b* is induced during osteoclast maturation and expressed in mature osteoclasts, where it colocalized with F-actin in podosomes. Overexpression of *Inpp4b* in RAW 264.7 cells demonstrated a direct negative effect on differentiation of osteoclast-like cells (OCLs), mainly by inhibition of NFATc1 nuclear translocation. Conversely, overexpression of a phosphatase-inactive mutant of *Inpp4b* in RAW cells results in an increase in NFATc1 activation and osteoclast differentiation. Overexpression of this *Inpp4b* inactive mutant also results in defective actin ring formation and decrease bone resorption. *In vivo*, osteoclast-targeted *Inpp4b* expression in transgenic mice leads to a significant increase of bone density with production of smaller osteoclasts in *gl/gl* transgenic mice. In summary, we demonstrated for the first time the direct implication of *Inpp4b* in osteoclast differentiation and activation.

## INTRODUCTION

An imbalance in the bone remodeling process due to a bone resorption defect leads to osteopetrosis. This bone disorder results from abnormal osteoclast differentiation or osteoclast maturation/activation. At present, the genes associated with human recessive osteopetrosis were identified based on murine mutations. Among the mouse models of osteopetrosis, the mouse grey-lethal (*gl*) mutant develops a severe phenotype that most closely resemble the human autosomal recessive infantile osteopetrosis (1-4). These *gl* mice display an osteoclast differentiation/maturation defect in addition to a melanocyte defect resulting in a grey coat color. Recently, we characterized the mouse *gl* gene that encodes a novel transmembrane protein, Gl (also named *Ostm1*), responsible for the osteopetrotic and pigmental *gl* null phenotypes (5). By homology, we isolated the human *GL* gene and identified the first human *GL* mutation in an osteopetrotic pedigree (6). While the molecular and intracellular functions of the *gl* protein remain to be elucidated, expression studies indicate that *gl* could play a role in the different steps of osteoclast differentiation, maturation and/or activation (4;5) .

Differentiation of monocyte-macrophage hematopoietic lineage precursors, into a mature osteoclast (osteoclastogenesis) is under the control of one major signaling pathway: RANK/RANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B/ligand) (7). The essential role of RANK signaling in osteoclastogenesis is demonstrated by the severe osteopetrosis in null RANK or RANKL mice (8;9). Upon RANKL molecular signaling from the osteoblasts bone-forming cells, the committed osteoclasts precursors migrate to the bone matrix and fuse to become multinucleated. Concomitant with these cellular events, a multi-protein intracellular signaling cascade is initiated by recruitment of the TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) by RANK (10). Initiation of this signaling cascade leads to the activation of MAP kinases (p38, JNK, ERK), of NF $\kappa$ B and of NFATc1. That consequently will trigger transcription of a set of osteoclast-specific genes in the pre-osteoclast, resulting in differentiation (11;12). In

conjunction, a survival signal/anti-apoptotic response in the pre-osteoclast cell is activated by a critical downstream effector of RANK signaling, the phosphatidylinositol 3-phosphate kinase (PI3kinase) acting through the serine/threonine kinase Akt/PKB (13-18).

Our previous work suggests that the intracellular mechanism that trigger the mature osteoclast to become activated could depend on the Gl protein (4). This process depends primarily on the binding of osteopontin protein present in the bone matrix by the vitronectin receptor ( $\alpha_v\beta_3$  integrin) present in the membrane of mature osteoclasts (19;20). The osteoclast polarization is then induced by the assembly and activation of a multi-protein complex including c-src and Pyk2 tyrosine-kinases, c-cbl, PI3 kinase and gelsolin. This membrane localized protein complex stimulates multiple actin filaments (F-actin) polymerization to produce individual podosomes, that form an actin network, also called actin ring (21-23). Once the actin ring has delimited a bone resorption lacunae, interdependent events occur by the fusion, at the plasma membrane, of trafficking intracellular vesicles containing chloride channels and proton pump (e.g. H<sup>+</sup> V-ATPase), creating the ruffled border (24;25). Acidification of the resorption lacunae and solubilization of the inorganic bone matrix, as well as proteolysis of collagen fibers is then triggered by active ionic transport and protease secretion from the osteoclast ruffled border (26;27). Mature osteoclasts can switch from this resorptive state to a motility state and migrate to an adjacent bone site. Normally, osteoclasts undergo several resorption/motility cycles and this phenomenon is highly dependent upon the dynamism of the podosomes turnover (22;28). Since gl/Ostm1 is a transmembrane protein, it could function in these differentiation/maturation processes through cell-cell, receptor-ligand or cell-matrix interaction as well as in intracellular signaling.

To identify novel direct/indirect gl targets in gl signaling cascade, we have undertaken a differential display screen (29;30). A most interesting candidate, the inositol polyphosphate 4-phosphatase type II (*Inpp4b*), was isolated and shown to be

consistently down-regulated in the *gl* osteopetrosis. Our studies demonstrate that Inpp4b has two independent cellular functions in osteoclast differentiation and maturation/activation. Inpp4b acts as a negative regulator of RANKL-induced signaling and overexpression of this phosphatase leads to impaired osteoclast lineage progression *in vitro* and *in vivo*. In the mature osteoclast, Inpp4b phosphatase activity is required for normal podosomes and actin ring formation. Altogether, our *in vitro* and *in vivo* results establish Inpp4b as an important regulator of both osteoclast differentiation and activation.

## METHODS

### Mice

The mouse strains *GL/Le dl<sup>l</sup> +/+gl* and *c-Src +/-* were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME), and progeny were genotyped as previously described (4;5;31).

### PCR-based differential display screening

PCR-based differential screening was conducted as described (32). Long bone total RNA was extracted with TRIzol (Invitrogen, Burlington, ON) and 20µg were treated with 20 U of RQ RNase-free DNase I (Invitrogen, Burlington, ON) at 37°C for 30 min. After extraction, precipitation and resuspension in DEPC-treated water, 0.5µg of RNA was annealed with 100 pmoles of primer T<sub>12</sub>NC, T<sub>12</sub>NG or T<sub>12</sub>NA (N = A,T,C or G) and reverse transcription was conducted. 2µl of RT-PCR reactions were PCR amplified with 2µl of 20µM arbitrary primer (OPA 16 to 20 see ref 32), 2 µl of 10mM T<sub>12</sub>NC, T<sub>12</sub>NG or T<sub>12</sub>NA primer, 1µl of dATP α<sup>35</sup>S (1200Ci/mmol) and Taq polymerase. Amplified cDNAs were separated on 6% sequencing gel and bands were excised from the dried gel, boiled 15min in H<sub>2</sub>O, precipitated and resuspended in H<sub>2</sub>O. After reamplification cDNAs were then cloned in pBluescript and sequenced.

### Cloning and sequencing of mouse *Inpp4b*

The sequence of the down-regulated DD-RT product was compared with the Mouse Genome Server ([www.ensembl.org/Mus\\_musculus](http://www.ensembl.org/Mus_musculus)) and found localized into a genomic region homologous to the human inositol polyphosphate 4-phosphatase type II (*INPP4b*) gene. Alignment of the rat *Inpp4b* sequence with mouse EST and TRACE databases sequences ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) allow us to design specific *Inpp4b* murine primers. The forward primer 5'-AAGCTTCCTGGGCTGTGCCAG-3' derived from the TRACE 8258396 sequence and the EST BG145663 used for the reverse primer 5'-GTGATGACATCATAGAGAGC-3'. This assay was used to screen

by PCR a C57BL/6 spleen cDNA mouse library (Stratagene, LaJolla, CA) (33). The isolated cDNA clone (sP4D12) contained an incomplete open reading frame of *Inpp4b* missing the most 5' 250 pb. Consequently, the 5' half of the coding sequence was amplified by RT-PCR amplification on spleen cDNA with the forward primer 5'-AACCGGAGCTCATTATTTGGTACCATTTG-3' and the reverse primer 5'-CTCTGTGCTGACATTAGGAG-3'. The amplified product was digested by *KpnI* and *SacI* restriction enzymes to obtain a 1389 bp fragment (5' half) and cloned with the 1507 bp *SacI/BglII* fragment (3' half) obtained from sP4D12 clone in pBlueScript in order to reconstitute a 2890 bp fragment containing the complete 2781 bp open reading frame of *Inpp4b*.

### **Inpp4b-EGFP fusion protein**

By PCR, using tailed oligonucleotides to generated *KpnI* and *XmaI* restriction sites, the *Inpp4b* stop codon was removed and the full-length mouse *Inpp4b* cDNA was cloned in the pEGFP-N1 vector (BD, Mississauga, ON) to generate the in frame *Inpp4b*-EGFP fusion protein. To abolish *Inpp4b* phosphatase activity the catalytic cysteine, C<sup>845</sup>, was mutated to an alanine. 20 ng of the pInpp4b-EGFP construct were amplified (*Pfu-turbo* DNA polymerase; Stratagene) with the forward 5'-GTTTACCTGCGCAAAAAGTGCC-3' and reverse 5'-GGCACTTTTTGCGCAGGTAAC-3' primers with a point mutation that change C<sup>845</sup> to A<sup>845</sup>. The PCR amplification product was digested with *DpnI* to eliminate the parental methylated non-mutated DNA, cloned and sequenced. The resulting construct was called pInpp4b(C845A)-EGFP.

### **Osteoclast production, expression analysis and "pits" assay**

Osteoclast like cells (OCLs) were generated *in vitro* by coculturing new-born primary FVB/NJ calvaria osteoblasts and bone marrow (BM) or spleen cells of either +/+ or *gl/gl* mice in  $\alpha$ -MEM containing 10% FBS,  $10^{-8}$  mol/L 1,25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> and  $10^{-6}$  mol/L prostaglandin E<sub>2</sub> (4). Total RNA (500 ng) from OCLs and various tissues from 3 week-old *gl/gl* and control wild-type mice were reverse-transcribed

(SuperScriptII transcriptase, Invitrogen). RT-PCR expression analysis of the *Inpp4b* alpha and beta 3' splicing isoforms used the same *Inpp4b* forward primer 5'-GATTAAAGAAGGCCAGTTGC-3' and two specific reverse *Inpp4b* primers: alpha reverse 5'-ACTTGGGGAAAGCCATCAGC-3' and beta reverse 5'-AGAAGTGTCGAGAAGTTGGC-3'. The specific alpha and beta PCR products were 533 bp and 447 bp respectively. *Ship* expression was monitored by amplification of a specific 348 bp product with *Ship* forward 5'-AGCTGCAACATTCCAAAGGC-3' and reverse 5'-CTGTATGGCGTGC GTTTGTC-3' primers. *Runx2* expression used *Runx2* forward 5'-TACCTGCCATCACTGACGTG-3' and *Runx2* reverse 5'-ATAGCGTGCTGCCATTCGAG-3' primers with PCR amplification of a specific 462 bp product. Other primers used included : *CtR* forward 5'-ACCGACGAGCAACGCCTACGC-3', and *CtR* reverse 5'-GCCTCACAGCCTTCAGGTAC-3'; *Intb3* forward 5'-TTACCCCGTGGACATCTACTA-3', and *Intb3* reverse, 5'-AGTCTTCCATCCAGGGCAATA-3'. Control  $\beta$ -actin expression was monitored using  $\beta$ -actin forward 5'-CAACGGCTCCGGCATGTGC-3' and reverse 5'-GAAGGTCTCAAACATGATCTGGGAC-3' primers which amplify a 349 bp specific fragment. All PCR products were resolved on 1.5% agarose slab gels and detected by ethidium bromide staining. Quantification of band intensity was performed using ImageQuant software.

Expression of the *Trap* and *Ctsk* gene was analyzed by Northern blot using specific cDNA probes prepared by RT-PCR on OCLs RNA : *Trap* forward 5'-TGTTCTCTGACCGTGCCCTTC-3' and *Trap* reverse 5'-CCCCTCAGCACATAGCCCA-3'; *Ctsk* forward 5'-GAGTCCCCAGAATCTTGTGG-3' and *Ctsk* reverse 5'-CTGGAAAGATGCCAAGCTTG-3'. An *Rpl32* specific probe was used as loading control (5). Transcripts sizes were : *Trap*, 1.5 kb; *Ctsk*, 1.5 kb; *Rpl32*, 0.7 kb.

Alternatively, OCLs were also obtained by differentiation of individual RAW stable transfectants in the presence of RANKL (10 or 50ng/ml). Identity of the resulting multinucleated OCLs was established following Tartrate Resistant Acid Phosphatase (TRAP) staining (34;35). For resorption assays, clones were seeded on dentin slices in 24 well plates and cultured for 4 days with RANKL (50ng/ml). After treatment with 0.1 mol/L of sodium hypochlorite, each slice was stained with 0.1% toluidine blue to reveal resorption “pits”.

#### **Inpp4b $\alpha$ -specific antibodies and immunofluorescence**

The cDNA fragment encoding amino acid 2 to 235 of mouse Inpp4b protein was amplified by PCR with the following tailed forward 5'-CCGCCTCGAGTGAAATCAAAGAGGAAGG-3' and reverse 5'-CAGACTCGAGACAGGATTCCTTAAGACTG-3' primers containing XhoI sites. The amplification product was digested and cloned into the XhoI site of the pHGST.2T bacterial expression vector (36). Following induction and expression in BL21 cells, the HisX6-Inpp4b(2-235)-GST recombinant fusion protein was purified using GST purification module (Amersham). Rabbit antisera were raised against this purified antigen and polyclonal antibodies were affinity purified with the antigen coupled to a HiTrap NHS-activated HP column (Amersham).

Immunofluorescence was conducted on primary osteoclasts and OCLs differentiated in culture (4 days) from stable transfected RAW cells. Cells were fixed, permeabilized and stained for filamentous actin (F-actin) with rhodamine-phalloidin (Molecular Probes, Eugene, OR) and Inpp4b $\alpha$  purified antiserum (1:100) followed by a FITC-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:100). Protein localization was revealed by immunofluorescence and confocal microscopy analysis (Axiophot Zeiss, Toronto, ON).

### **Transfections, protein extractions and Western blotting**

RAW 264.7 cell line (TIB-71) obtained from ATCC (Manassas, VA) were transfected using Lipofectamin (Invitrogen, Burlington, ON). Stable clones expressing EGFP, Inpp4b-EGFP or Inpp4b(C845A)-EGFP were selected with G418 (500 $\mu$ g/ml), and growth curve of individual RAW 264.7 clones were established with MTT colorimetric assay (37). To generate OCLs each individual clone was cultured on plastic or on glass coverslips in  $\alpha$ -MEM medium with 10% FBS and RANKL (10 or 50ng/ml). For stimulation experiments cells were culture in  $\alpha$ -MEM medium with 0.5% FBS for 24h and then stimulated with 100 ng/ml of RANKL for various times. Protein extraction and Western blot analysis were conducted as described (4), using phosphospecific antibodies against AKT (phospho T-308 and phospho S-473), p38, ERK and JNK (Cell Signal), or Inpp4b polyclonal purified antiserum. Alternatively blots were striped and reprobod with antibody against total NF $\kappa$ B p50 (Santa Cruz Biotechnology), NFATc1,  $\beta$ -actin (BD Biosciences), JNK and AKT (Cell Signal).

### **Production of transgenic mice**

The coding sequence of the mouse *Inpp4b $\alpha$*  gene (3.5kb) was cloned under the control of the 1.8 kb specific TRAP promoter kindly provided by Dr Roodman (38), whereas the human hGH gene with polyA signal has been linked downstream. Linearized ~7.5kb transgene fragment was microinjected (1ng/ $\mu$ l) into fertilized mouse oocytes isolated from F1(C3H X C57BL/6) X C57BL/6 crosses, and founders TRAP-Inpp4b<sup>TG</sup> were identified by PCR. Histology and staining of bone samples were conducted as described (4). Bone parameters quantification used Piximus and microCT technologies. All animal experiments complied with the guidelines of the Canadian Committee for Animal Protection and were approved by the local institutional animal care committee.

## RESULTS

### Identification of *Inpp4b* $\alpha$ as a target of *gl*

Since osteopetrosis is associated with numerous transcriptional modulation, we designed a differential display screen to systematically compare bone mRNA expression profiles from *gl/gl* homozygous and wild-type control mice. One of the identified transcripts corresponds to a novel cDNA that was consistently down-regulated in *gl/gl* bone tissue. By sequence comparison, this transcript was identified as the *Inpp4b* $\alpha$  murine homologue. Semi-quantitative RT-PCR from *gl/gl* total bone tissue or OCLs generated in cocultures from spleen hematopoietic precursors, showed significant down-regulation of this transcript relative to wild-type controls (Fig. 2-1A,B). To further verify whether the down-regulation of this phosphatase was specific to *gl/gl* phenotype, expression of another phosphatase, SH2-containing inositol 5-phosphatase 1 (*Ship1*) which has a role in bone homeostasis (39), was analyzed. Figure 2-1A and 2-1B shows that *Ship1* expression was unaffected in *gl/gl* bone tissue, further supporting that the down-regulation of *Inpp4b* $\alpha$  was specific to *gl/gl*. In addition, expression of *Inpp4b* $\alpha$  was also monitored in another osteopetrotic mutant, the *c-src* null mice (*c-src*<sup>-/-</sup>) (40). Bone tissue of *c-src*<sup>-/-</sup> mice displayed comparable *Inpp4b* $\alpha$  expression as the wild-type control (Fig. 2-1C), suggesting furthermore that down-regulation of *Inpp4b* $\alpha$  observed in *gl/gl* mice represented a direct effect of this mutation.

### Differential expression of the *Inpp4b* $\alpha$ isoform in osteoclasts

The rat and the human genome has potentially two alternatively expressed *Inpp4b* isoforms ( $\alpha$  and  $\beta$ ) in brain (41). Specific assays for the mouse gene were designed to detect this alternative splicing of the last exon. To determine whether one or both of these two *Inpp4b* isoforms may have a role in osteoclast, their expression profiles were established in wild type mouse bone tissues and bone cells by semi-quantitative RT-PCR analysis. Analysis of *Inpp4b* expression from wild-type long bone tissues

(LB), containing both osteoclasts and osteoblasts demonstrated expression of only the *Inpp4b $\alpha$*  isoform in association with expression of a typical osteoclast gene *Ship1* and osteoblast gene *Runx2* (Fig. 2-1D). From the analysis of the two main bone cell subpopulations, *Inpp4b $\alpha$*  expression was undetectable in primary osteoblasts (OB) whereas it is highly expressed in osteoclasts like-cell (OCLs), indicating a predominant role in osteoclasts. In contrast, *Inpp4b $\beta$*  was not detected in LB or in osteoclasts, but abundant in the brain.

The kinetic of *Inpp4b $\alpha$*  expression during osteoclast differentiation and maturation was established using a wild-type bone marrow coculture system from which cells were withdrawn at various times during differentiation for RNA analysis. Expression of *Inpp4b $\alpha$*  was not detected in bone marrow cells or in the first days of differentiation. In contrast, from day 8 to 12 a progressive increase in *Inpp4b $\alpha$*  expression was measured which correlated with appearance of mature OCLs (Fig. 2-1E), implicating that *Inpp4b $\alpha$*  is transcriptionally regulated during OCLs differentiation.

### ***Inpp4b $\alpha$* as a modulator of cell growth**

It is known that *in vitro*, inositol phosphatases such as PTEN and SHIP counterbalance PI3 kinase action by modulating level of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> and PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> second messengers which are believed to play a role in cell proliferation, differentiation, survival and endocytosis. Since the onset of *Inpp4b $\alpha$*  expression occurs during osteoclast differentiation and active proliferation, we sought to investigate the role of *Inpp4b $\alpha$*  and particularly the role of *Inpp4b $\alpha$*  phosphatase activity in these processes by using the monocytic RAW 264.7 cell model system. This cell line can be induced to differentiate into multinucleated resorbing osteoclasts in response to RANKL. Stable RAW 264.7 clones established by transfection of *Inpp4b $\alpha$* -EGFP fusion protein as well as the phosphatase inactive *Inpp4b $\alpha$*  (C845A)-EGFP were generated. These transfected RAW clones without RANKL were first

monitored for Inpp4b expression by Western blot. As shown in Figure 2-2A, the endogenous 105kDa Inpp4b $\alpha$  protein was barely detectable in all clones whereas the transfected 130kDa Inpp4b $\alpha$  phosphatase active and inactive fusion proteins were significantly overexpressed in comparison to endogenous or to the transfected empty vector control (Fig. 2-2A). The cell growth rate in these RAW transfectants was then measured over a 6-day period. From three experiments, the two independent active Inpp4b $\alpha$  transfectants (n=2) showed a significantly reduced cell growth by at least 3-fold (Fig. 2-2B) compared to the transfected controls. In contrast, the phosphatase inactive mutant fusion protein (C845A) did not affect cell growth (clone C845A-3 and -4) despite comparable overexpression levels. These results indicate that Inpp4b $\alpha$  can act as a negative growth regulator and that the phosphatase activity is essential for this function.

#### ***Inpp4b* $\alpha$ is a negative regulator of osteoclast differentiation**

To evaluate Inpp4b $\alpha$  overexpression on osteoclast differentiation, transfected RAW cells were cultured for 2 to 5 days in presence of RANKL. Quantification on the number of mature osteoclasts was undertaken by TRAP staining for a given number of cells and in function of various time points. As shown on Figure 2-3A, OCLs production was significantly reduced by overexpression of active Inpp4b-EGFP compared to inactive Inpp4b(C845A)-EGFP and control EGFP clones. The OCLs derived from Inpp4b-EGFP expressing cells were also smaller and have lower number of nucleus in each cell (Fig. 2-3A,B). In contrary, overexpression of Inpp4b(C845A)-EGFP promotes an increase differentiation potential compared to transfected control. In addition to the production of larger multinucleated TRAP positive osteoclasts, the differentiation rate was increased by ~2-fold. In fact, multinucleated (2-3 nucleus) OCLs were apparent by 2-3 days in culture (Fig. 2-3B), while only mononucleated cells were detected in control and active Inpp4b $\alpha$  expressing cells at the same stage, suggesting that a functional inositol phosphatase activity modulate differentiation rate. Such opposite differentiation responses also

indicate that the phosphatase inactive Inpp4b $\alpha$  may act as a dominant-negative by overriding the endogenous Inpp4b $\alpha$  negative regulation on osteoclasts.

### **Inpp4b $\alpha$ alters the NFATc1 pathway in osteoclast differentiation**

To decipher the intracellular pathway(s) modulated by Inpp4b $\alpha$ , we investigated the major signaling pathway(s) implicated in osteoclast differentiation: MAPK, NF $\kappa$ B and NFATc1. In addition, we have also looked at the PI3K/AKT pathway, which has been shown to be activated by RANKL and to protect from apoptosis the osteoclast progenitors and mature cells (42). Activation of these downstream effectors upon RANKL/RANK differentiation signal occurs by modification of their phosphorylation state and of their cellular localization from the cytosol to the nucleus in the case of transcription factors (17;43;44).

To determine whether Inpp4b $\alpha$  could be involved in activation of the AKT and of the MAPK pathways, the phosphorylation of AKT, p38, ERK and JNK in RAW cells overexpressing EGFP, Inpp4b $\alpha$ -EGFP or Inpp4b $\alpha$ (C845A)-EGFP was first monitored as a readout of the activation of these proteins. We verified that the total protein expression level was similar prior and during RANKL stimulation using total JNK and total AKT as internal standards (Fig. 2-4). Protein phosphorylation analysis showed no detectable kinetic or level changes in the p38, ERK and JNK kinases for Inpp4b $\alpha$ -EGFP, Inpp4b $\alpha$ (C845A)-EGFP overexpressing clones compare to empty control vector clone (Fig. 2-4), suggesting that Inpp4b $\alpha$  is most likely not involved in the regulation of the MAPK pathways. Similarly, no significant change was observed in the phosphorylation status of AKT for Inpp4b $\alpha$ -EGFP, Inpp4b $\alpha$ (C845A)-EGFP overexpressing clones compare to empty control vector clone.

Secondly, we then established the localization of the NFATc1 and NF $\kappa$ B p50 transcriptional factors by protein analysis from nuclear extracts of these same transfected cells. When active Inpp4b $\alpha$  was overexpressed, nuclear translocation in

presence or absence of RANKL was reduced for both NFATc1 and NFκB p50 relative to control (Fig. 2-5A). However, overexpression of the Inpp4bα (C845A) mutant resulted in a constitutive increased nuclear localization of NFATc1 and NFκB p50, independent of RANKL signaling (Fig. 2-5A). In fact, the expression level of NFATc1 in these mutant cells was significantly elevated both in nucleus and total cell extracts (Fig. 2-5B) compared to those of control empty vector. This is consistent with an autoamplification of NFATc1, a documented mechanism that appear positively regulated by Inpp4bα(C845A) inactive mutant (43).

NFATc1 have been shown to be important transcriptional regulators of osteoclast-specific genes, and target genes regulated by this factor include calcitonin receptor (*CtR*),  $\alpha_v$  and  $\beta_3$  integrin subunit (*Itgav* and *Itgb3*), cathepsin K (*Ctsk*), tartrate resistant acid phosphatase (*Trap*) and *NFATc1* itself (11;45;46). Considering the negative effect of Inpp4b on NFATc1 nuclear translocation we have investigated by Northern blot or RT-PCR the expression kinetics of these genes during RAW cells differentiation in OCLs following RANKL treatment (Fig. 2-5C). In vector transfected control cells, *CtR*, *Itgb3*, *Itgav*, *Nfatc1*, *Ctsk* and *Trap* genes expression appear between 24 to 72h following RANKL treatment. In cells overexpressing Inpp4bα there is mark decrease in detectable mRNA for of *CtR*, *Itgb3* and *Ctsk*, even at 72h of RANKL treatment. While a small reduction is observed in *Itgav* and *Nfatc1* induction in the presence of Inpp4bα, *Trap* mRNA expression kinetic stay unaffected in these cells. In Inpp4bα(C845A) inactive mutant overexpressing cells *Ctr*, *Itgb3* and *Ctsk* induction following RANKL treatment stay unaffected or even is slightly increased for *Itgav*, *Nfatc1* and *Trap* compared to control. Together, these results suggest that Inpp4bα is a negative modulator of NFATc1 nuclear translocation and consequently of matures osteoclast-specific genes transcription.

### **Inpp4b $\alpha$ contributes to osteoclast dynamic cytoskeleton remodeling**

Because a role for Inpp4b $\alpha$  in osteoclast differentiation does not exclude one in mature osteoclast (4), we have also undertaken an analysis of Inpp4b $\alpha$  in multinucleated differentiated OCLs. Assessment of Inpp4b $\alpha$  protein subcellular localization was carried out in fully differentiated OCLs from control EGFP or Inpp4b $\alpha$ -EGFP transfected RAW cells and in wild type primary osteoclasts isolated from bone samples using immunofluorescence (Fig. 2-6A-F). Localization of Inpp4b $\alpha$ -EGFP was observed in the peripheral cellular actin ring as intense dot-like signals. A much weaker staining was also present in perinuclear cytoplasmic compartment of Inpp4b $\alpha$ -EGFP OCLs (Fig. 2-6A,D) whereas the empty vector transfectants (data not shown) had diffuse non-specific EGFP staining. Consistent with the Inpp4b $\alpha$ -EGFP localization, the native Inpp4b $\alpha$  protein was found in the actin ring of primary osteoclasts using our specific antibody (Fig. 2-6G, J). To monitor whether Inpp4b $\alpha$  localize specifically to the podosomes, co-staining with F-actin and Inpp4b $\alpha$  was performed (Fig. 2-6B,E,H,K). As shown in Figure 2-6, colocalization of the two proteins provided evidence that Inpp4b $\alpha$  is primarily in osteoclast podosomes (Fig. 2-6 I,L).

Based on the localization of Inpp4b $\alpha$  to podosomes in osteoclasts, we evaluated the effect of overexpressing the phosphatase active or inactive Inpp4b $\alpha$  on the actin ring formation of OCLs. OCLs derived from Inpp4b $\alpha$ (C845A)-EGFP overexpressing cells displayed EGFP localization to the podosomes as observed in OCLs derived from Inpp4b-EGFP expressing cells (Fig. 2-7A-C). However, these OCLs exhibited multiple small actin rings instead of a unique peripheral ring composed of multiple podosomes (Fig. 2-7D-F). Noticeably, these smaller rings have a much thicker appearance and were potentially formed of multiple concentric rows of podosomes. Such aberrant structures indicate that Inpp4b phosphatase activity plays a major role in the dynamic process of osteoclast cytoskeleton rearrangements.

### **Inpp4b $\alpha$ a regulator of bone resorption**

Subsequently, we have undertaken a functional analysis of OCLs derived from our RAW transfectants by assessing bone resorption activity on dentine slices (47). The Inpp4b $\alpha$ -EGFP OCLs demonstrated some resorption activity but at a lower level than control OCLs (Fig. 2-7H,I). While this decreased number of resorbing pits could be attributed to the reduced OCLs population, the size of these pits are generally smaller which suggested that overexpression of Inpp4b $\alpha$  can impair resorption activity. In parallel, OCLs derived from Inpp4b $\alpha$ (C845A)-EGFP overexpressing cells were unable to form resorption pits (Fig. 2-7J), despite producing more OCLs of larger size (Fig. 2-3). These assays indicated that Inpp4b and more specifically its phosphatase activity, is critical for resorption. This also suggests that the inactive Inpp4b $\alpha$ (C845A) protein mutant acts as a potent dominant negative effector on endogenous Inpp4b $\alpha$  at the mature osteoclast stage.

### **Inpp4b leads to increase *gl/gl* bone mineral density in transgenic mice**

To determine whether the modification observed during *in vitro* differentiation and maturation/activation of Inpp4b transfectants were functionally relevant, the role of Inpp4b was characterized *in vivo*. We generated transgenic mice expressing the Inpp4b $\alpha$  cDNA under the control of the osteoclast lineage specific TRAP promoter (Fig. 2-8A) (31;44;48). Two transgenic lines were established with the TRAP-Inpp4b $\alpha$  transgene and OCLs specific expression was demonstrated by RT-PCR analysis (Fig. 2-8B). Mice expressing this transgene at a level comparable to endogenous Inpp4b were phenotypically undistinguishable from their wild-type littermates.

Since these mice did not develop an osteopetrotic phenotype and that Inpp4b $\alpha$  was down-regulated in *gl* osteopetrosis, a complementation study was undertaken. The transgenic TRAP-Inpp4b $\alpha$  mice were then successively crossed with *gl/+* mice to generate *gl/gl* TRAP-Inpp4b $\alpha$ <sup>TG</sup> mice in which osteopetrosis was monitored. All

*gl/gl* TRAP-Inpp4b $\alpha$  transgenic mice appeared to display a similar phenotype compared to *gl/gl* non-transgenic littermates with a characteristic growth delay compared to wild-type controls, lack of tooth eruption and early death around three weeks of age. Absence of complementation suggested that down-regulation of *Inpp4b $\alpha$*  in *gl/gl* osteoclasts were not directly responsible for the development of osteopetrosis. However, upon close histological examination of *gl/gl* TRAP-Inpp4b $\alpha$ <sup>TG</sup> long bone sections a significant increase in trabecular bone compare to *gl/gl* non-transgenic samples was observed (Fig. 2-8C). Quantification by Piximus or microCT of this bone mass demonstrated a significant 10-20% increase in bone mineral density (BMD) and in bone volume fraction (BV/TV%) in *gl/gl* Inpp4b $\alpha$ <sup>TG</sup> versus *gl/gl* mice (Fig. 2-8D). Analysis of trabecular number (TbN), trabecular spacing (TbSp) and trabecular thickness (TbTh) concur to show significantly increase in bone density in *gl/gl* Inpp4b $\alpha$ <sup>TG</sup> (Fig. 2-8D, table 2-1 and 2-2). To determine whether increased in bone density results from alteration in the osteoclast population of *gl/gl* TRAP-Inpp4b $\alpha$ <sup>TG</sup> relative to *gl/gl*, femurs were stained for osteoclast with the TRAP assay. While the *gl/gl* non-transgenic mice had an increase in osteoclast number compare to wildtype (+/+) mice (4), the *gl/gl* TRAP-Inpp4b $\alpha$ <sup>TG</sup> mice displayed a decrease in the osteoclast population compare to *gl/gl* mice (Fig 2-8C). These results suggest that the decrease expression of *Inpp4b* in *gl* represents a compensatory mechanism in order to allow more osteoclast to differentiate. Interestingly, as previously showed in RAW transfections (Fig. 2-3B), these *gl/gl* TRAP-Inpp4b $\alpha$ <sup>TG</sup> mice also produced osteoclast of smaller size (Fig. 2-8C).

Because the reduced number of osteoclast in *gl/gl* TRAP-Inpp4b $\alpha$ <sup>TG</sup> could arise from a negative regulation on osteoclast lineage differentiation, we evaluated *in vitro* the potential of splenic hematopoietic progenitors isolated from these *gl/gl* TRAP-Inpp4b $\alpha$ <sup>TG</sup> transgenic mice to produce OCLs. The *gl/gl* TRAP-Inpp4b $\alpha$ <sup>TG</sup> hematopoietic progenitors showed a reduced osteoclastogenesis potential in comparison to wild-type non-transgenic, wild-type TRAP-Inpp4b $\alpha$ <sup>TG</sup> transgenic and

*gl/gl* non-transgenic progenitors (Fig. 2-8E). Importantly, the transgene expression does not affect the potential of wild-type hematopoietic progenitors to generate osteoclast *in vitro* (Fig. 2-8E). Consistently, no significant increase in bone mass is observed in wild-type transgenic mice compare to wildtype non-transgenic littermates *in vivo* (Table 2-1 and 2-2).

## DISCUSSION

We recently cloned the gene mutated in the osteopetrotic *gl* mouse strain (3). In order to characterize novel direct/indirect *gl* targets, we have undertaken a differential display screen. Among the several down-regulated bone transcripts identified in *gl/gl* samples, one encoded the Inositol polyphosphate 4-phosphatase type II (*Inpp4b*) which expression is normally detected in mature osteoclasts. *Inpp4b* retained our attention since previous experimental data have shown that PI3 kinase pathway can participate in osteoclast differentiation in response to RANKL (13;49). This pathway has also been involved in cytoskeleton rearrangements leading to osteoclast ruffled border and actin ring formation (25). Thus, *Inpp4b* by regulating the metabolism of a lipid second messenger, represented a strong candidate in the control of osteoclast differentiation and activation.

In mammals, two inositol polyphosphate 4-phosphatase isoenzymes, *Inpp4a* and *Inpp4b*, have been identified (41;50). *In vitro*, *Inpp4a* $\alpha$  and *Inpp4b* $\alpha$  catalyze the hydrolysis of the D-4 position phosphate of the PI3 Kinase second messenger, phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate (PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>) producing phosphatidylinositol 3-monophosphate (PtdIns(3)P) (41;50). Few studies on *Inpp4a* $\alpha$  have been reported. *Inpp4a* $\alpha$  can form a complex with PI3 kinase in human platelet cytosol that becomes translocated to the actin cytoskeleton after thrombin stimulation (51). In megakaryocytes, *Inpp4a* $\alpha$  is a potential negative regulator of cell growth acting downstream of the GATA-1 transcription factor (52) and it has been localized to endosomes and plasma membrane (53;54). No specific *in vivo* role has been uncovered for *Inpp4b* $\alpha$ .

In our screen *Inpp4b* expression was specifically and reproducibly down-regulated in *gl/gl* osteoclasts. Since osteopetrosis is associated with a reduction of the bone marrow compartment, *Inpp4b* down-regulation in bone tissue may have been secondary to a change in hematopoietic cell populations and differential expression of

hematopoietic-specific genes (55;56). To rule out this hypothesis, we demonstrated that down-regulation was not secondary to osteopetrosis as normal expression of another inositol phosphatase, *Ship1*, involved in bone homeostasis (39) was unchanged in *gl* mice. Furthermore, *Inpp4b* expression stays unaffected in the *c-src*<sup>-/-</sup> osteopetrotic mutant excluding the possibility of an indirect effect of osteopetrosis on *Inpp4b* expression in *gl/gl* mice.

We first used RAW 264.7 monocytic cell line as a model for osteoclast differentiation in to analyze the role of Inpp4b $\alpha$  activity in osteoclasts. In this experimental system, we showed that overexpression of Inpp4b $\alpha$  reduced the cell growth and differentiation potential of these cells in response to RANKL. A similar result previously associated Inpp4a $\alpha$  overexpression with negatively regulation of megakaryocytes and fibroblasts growth (52). Importantly, this effect depends of the catalytic phosphatase activity of Inpp4b $\alpha$ , since overexpression of a phosphatase-inactive mutant of Inpp4b potentiates the differentiation of RAW cells in osteoclast following RANKL stimulation.

Since it is known that upon RANKL stimulation PI3 kinase is activated to produce the second messengers PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> and PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> and that Akt/PKB serine/threonine kinase has been shown to be activated in a PI3 kinase dependent matter by RANK, we have investigated if overexpression of Inpp4b in RAW cells may result in a decreased level of PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> and in AKT inhibition. However, we failed to observed significant reduction in the phosphorylation of T308 and S473 residues of AKT when Inpp4b $\alpha$  is overexpressed, suggesting that Inpp4b $\alpha$  does not regulates osteoclast differentiation through AKT inhibition. The small effect of Inpp4b $\alpha$  on AKT phosphorylation may be explained by two hypothesis: 1) PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> is not essential for AKT activation, but may regulate other downstream targets implicated in osteoclast differentiation; or 2) PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> is not preferentially a substrate of Inpp4b $\alpha$  in vivo. Importantly, we also demonstrated here that Inpp4b $\alpha$

does not regulate RANKL-dependent activation of the three classical MAPK pathways (ERK, JNK, p38).

More recently, the NFATc1 transcription factor has been proposed as the master regulator of osteoclastogenesis. In fact, ectopic expression of a constitutively active form of NFATc1 cause bone marrow monocytes (BMMs) to undergo osteoclast differentiation in absence of RANKL, demonstrating the essential and sufficient role of this factor in osteoclastogenesis (44). Here we show that overexpression of Inpp4b $\alpha$  in RAW cells abrogates NFATc1 nuclear translocation. Conversely, a phosphatase-inactive mutant of Inpp4b is sufficient to induce constitutive nuclear localization of NFATc1 and accumulation of this factor, probably via autoamplification. These results suggest that the negative effect of Inpp4b on osteoclast differentiation may involve a regulatory mechanism affecting NFATc1 nuclear translocation. Interestingly, overexpression of Inpp4b $\alpha$  block both RANKL-induced NFATc1 nuclear translocation and osteoclast-specific gene expression (*CtR*, *Itgb3* and *Ctsk*), while Inpp4b $\alpha$ (C845A) phosphatase inactive mutant induces a constitutive nuclear localization of NFATc1 without affecting the kinetic of osteoclast-specific gene expression. This may indicate that other osteoclast-specific and RANKL-activated transcription factors, such as AP1, PU.1 and Mitf, must cooperate with NFATc1 in order to induce transcription of osteoclast-specific genes (44-46;57).

It is well documented that NFATc1 nuclear translocation is under the control of the calcium-regulated phosphatase calcineurin (58). Activation of the calcium/calcineurin pathway requires the production of inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>), by phospholipase-C gamma (PLC $\gamma$ ), which use PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> as substrate. Subsequent binding of IP<sub>3</sub> to its receptor (IP<sub>3</sub>R) on endoplasmic reticulum activate the release of calcium from intracellular stores to the cytoplasmic compartment (58). This increase in calcium activates the calcium-sensitive phosphatase calcineurin that dephosphorylates NFATc1, unveiling nuclear localization signal and allowing

nuclear translocation. Little is known about the turnover of the  $IP_3$  signal except that it can be phosphorylated by  $IP_3$  3-kinase to generate inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate ( $IP_4$ ). It is known that in addition to the lipid substrate  $PtdIns(3,4)P_2$ ,  $Inpp4b\alpha$  has also two soluble substrates *in vitro* : inositol 1,3,4-triphosphate ( $Ins(1,3,4)P_3$ ) and inositol 3,4-bisphosphate ( $Ins(3,4)P_2$ ) (41). As summarized in Figure 2-9, it is possible that inositol phosphatase activity such as  $Inpp4b\alpha$  could be implicated in the degradation of  $IP_3$  subproducts in order to terminate this signal. Future work will focus on the mechanism by which  $Inpp4b$  modulates calcium signaling in osteoclast and in other cell types.

In addition to a role in osteoclast precursors proliferation and differentiation, we obtained evidence for a role of  $Inpp4b\alpha$  in mature osteoclast activation associated with major cytoskeleton rearrangements. First, we showed that the  $Inpp4b$ -EGFP fusion proteins and the endogenous  $Inpp4b\alpha$  protein colocalized with F-actin in podosomes of OCLs and of primary osteoclasts respectively. As it is known that the  $Inpp4a\alpha$  protein can associate with PI3 kinase in platelets to form a complex that is translocated to the actin cytoskeleton in an integrin- and aggregation-dependent manner (51),  $Inpp4b\alpha$  in the osteoclast could be required at the site of actin polymerization to regulate the level of  $PtdIns(3,4)P_2$  produced by PI3 kinase at the plasma membrane. Consequently,  $Inpp4b\alpha$  activity may negatively regulate protein-lipid interactions implicated in actin polymerization. Interestingly, OCLs overexpressing the  $Inpp4b\alpha$  phosphatase-inactive EGFP fusion protein exhibit supernumerary small F-actin rings and are unable to resorb dentine. Unlike focal adhesions, podosomes are highly dynamic structures with a 2-12-min life span compared with 30 min for the former (22). One possible mechanism by which PI3 kinase may activate actin polymerization is through the actin-binding protein gelsolin. Upon osteoclast bone matrix attachment, osteopontin present in bone tissue stimulates PI3 kinase activity, leading subsequently to a local increase level of polyphosphoinositides such as  $PtdIns(3,4)P_2$  and  $PtdIns(3,4,5)P_3$  (59). Then,

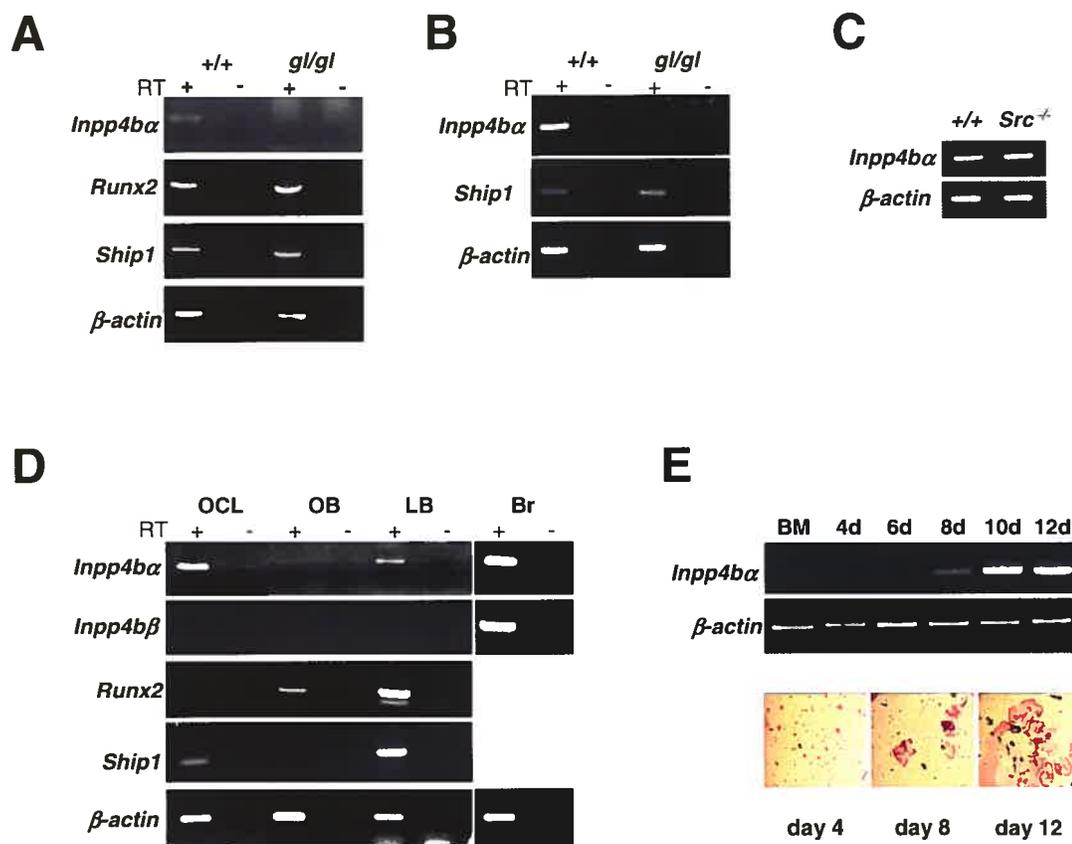
interaction between these phosphoinositides and gelsolin results in the release of gelsolin from the actin filament ends (uncapping), providing a site for rapid monomer addition (60). Since gelsolin deficiency in mice blocks podosomes assembly and results in an increased bone mass (61), it is likely that inositol phosphatase hydrolyzing PI3 kinase second messengers may be responsible, at least in part, for this rapid podosomes turnover. If this is the case, this model predicts that Inpp4b phosphatase activity is required at the site of podosomes formation to ensure normal turnover and patterning of F-actin (22;62). Consequently, the presence of a phosphatase-inactive Inpp4b at the site of actin polymerization would be associated with a sustained high level of PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>, resulting in the formation of numerous smaller actin rings as observed in OCLs derived from overexpressing phosphatase-inactive Inpp4b protein transfectants.

Our results raise another interesting question: why is *Inpp4b* expression reduced in *gl* mice and how does it contribute to the osteopetrotic phenotype in these mice? This mechanism is likely to be cell autonomous, as *Inpp4b* is also down-regulated in vitro in *gl* osteoclast cultures. Interestingly, *gl* hematopoietic precursor also display a cell autonomous increase in their osteoclastogenesis potential (4). It is possible that the Gl protein acts in a signaling pathway that controls *Inpp4b* expression, so that in *gl* mice this pathway is disrupted. The down-regulation of *Inpp4b* expression may also be a feedback response to correct the cell defects associated with lack of Gl protein expression. This latter hypothesis is supported by the TRAP-*Inpp4b*α *gl/gl* transgenic phenotype that is characterized by an increased bone mineral density and fewer osteoclasts. Our data suggest that the *gl* osteoclasts reduced capacity to resorb bone matrix is compensated by a mechanism that stimulates osteoclast differentiation, probably via an autocrine loop. This eventually results in an increase of the bone-resident osteoclast population. This compensatory mechanism may be achieved by down-regulation of negative regulators expression of osteoclast differentiation such as *Inpp4b*. Future work will focus on transcriptional mechanisms that regulate *Inpp4b* expression in wild type and *gl* osteoclast.

In summary, our results demonstrated for the first time the implication of Inpp4b activity in osteoclast *in vitro* and *in vivo*. Here, we provide evidence supporting Inpp4b as a negative regulator of osteoclast differentiation in response to RANKL through the NFATc1 pathway. Furthermore, this study also implicates Inpp4b as a positive regulator of cytoskeleton rearrangements through podosomes turnover and actin ring formation, two essential cellular components for osteoclast bone resorption activity.

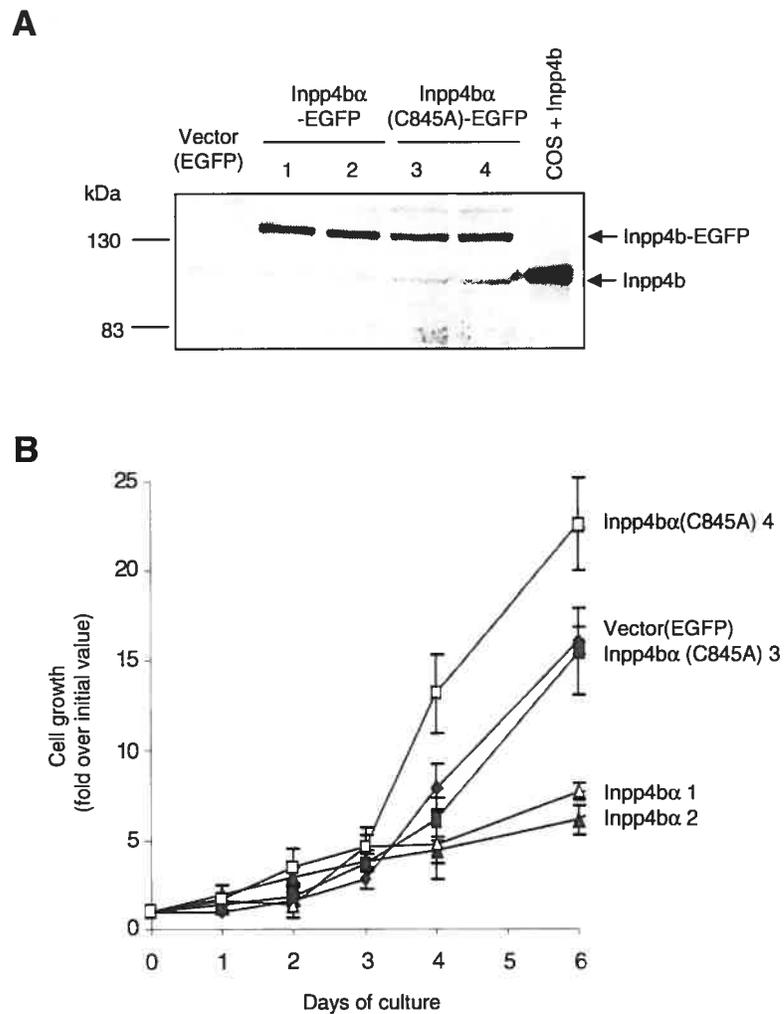
## **ACKNOWLEDGMENTS**

We are grateful to Drs T. Garcia, P. Mollat, A. Veillette, S. Meloche, S. Reddy and D. Roodman for supplying materials. The support of the Centre for Bone and Periodontal Research (Montreal) in Piximus and microCT analysis is acknowledged. This work was supported by Canadian Institutes of Health Research (MOP44079) and National Sciences and Engineering Council of Canada (OPG0155277) grants to J.V. M.F. is supported by a doctoral training award from the Canadian Institutes of Health Research.

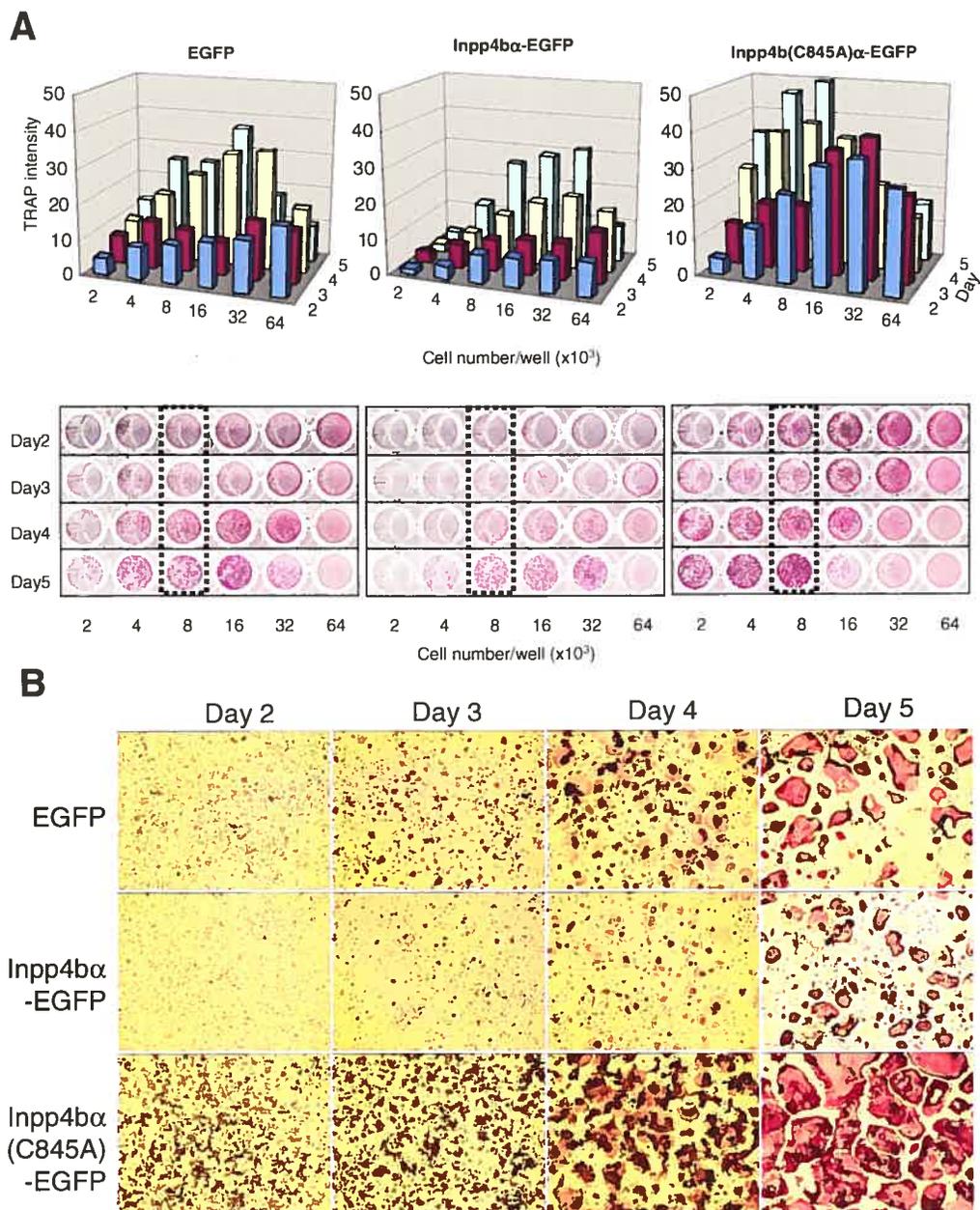


**Figure 2-1.** *Inpp4bα* expression in wild-type and *gl/gl* bone cells.

**A.** *Inpp4bα* expression in wild-type (+/+) and *gl* homozygous (*gl/gl*) long bone obtained by RT-PCR. The amount of input cDNA was normalized with respect to  $\beta$ -actin control. Expression of *Runx2* and *Ship1* served as specific osteoblast and osteoclast markers respectively. **B.** *Ex vivo* expression of *Inpp4bα* in wild-type (+/+) and homozygous (*gl/gl*) derived OCLs. **C.** *Inpp4bα* expression in bone tissues from the osteopetrotic *c-src*<sup>-/-</sup> mice and wild-type (+/+) controls. **D.** *Inpp4bα* and  $\beta$  isoforms expression in wild-type long bone (LB) osteoblasts (OB) and osteoclast like cells (OCLs). Brain (Br) RT was used as a positive control for *Inpp4b* isoforms. **E.** Kinetics of *Inpp4bα* mRNA expression during osteoclast differentiation. OCLs were produced in bone marrow/osteoblast cell cocultures and revealed following TRAP staining.

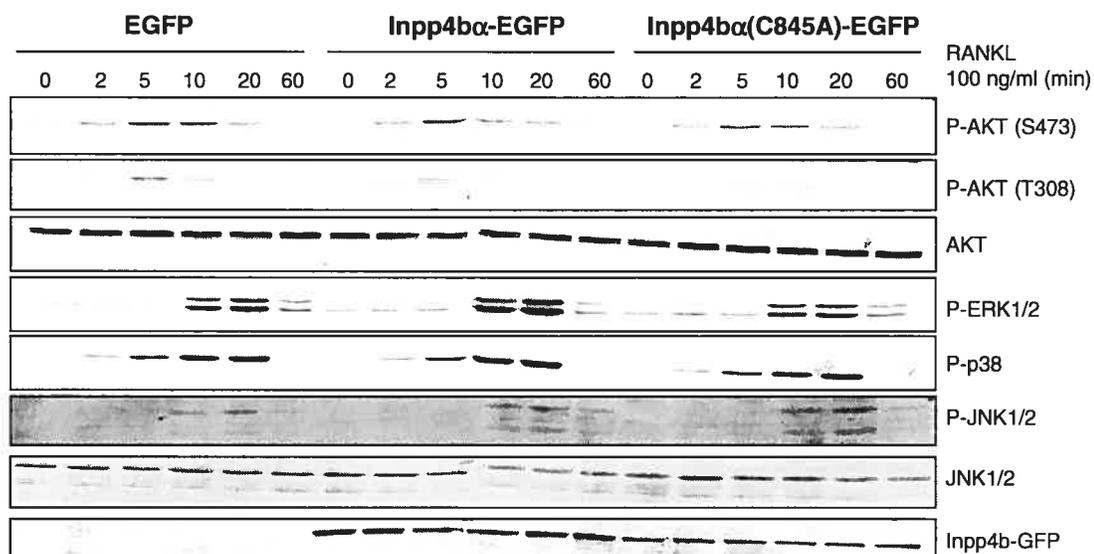


**Figure 2-2. Stable expression of Inpp4b $\alpha$ -EGFP and Inpp4b $\alpha$ (C845A)-EGFP in RAW 264.7 cells**  
**A.** Stably transfected cell lines were established with the EGFP, Inpp4b $\alpha$ -EGFP and Inpp4b $\alpha$ (C845A)-EGFP constructs (see Methods). To confirm overexpression of these different proteins, Western blot analysis was performed on total cell lysates from the indicated stable cell lines using our specific Inpp4b rabbit polyclonal antibody. **B.** Cell growth kinetics for individual RAW stables transfected clones maintained in culture for 1 to 6 days. Cell growth index was evaluated following the MTT colorimetric assay as described in methods, and each value represents an average four replicates expressed as mean  $\pm$  SD.



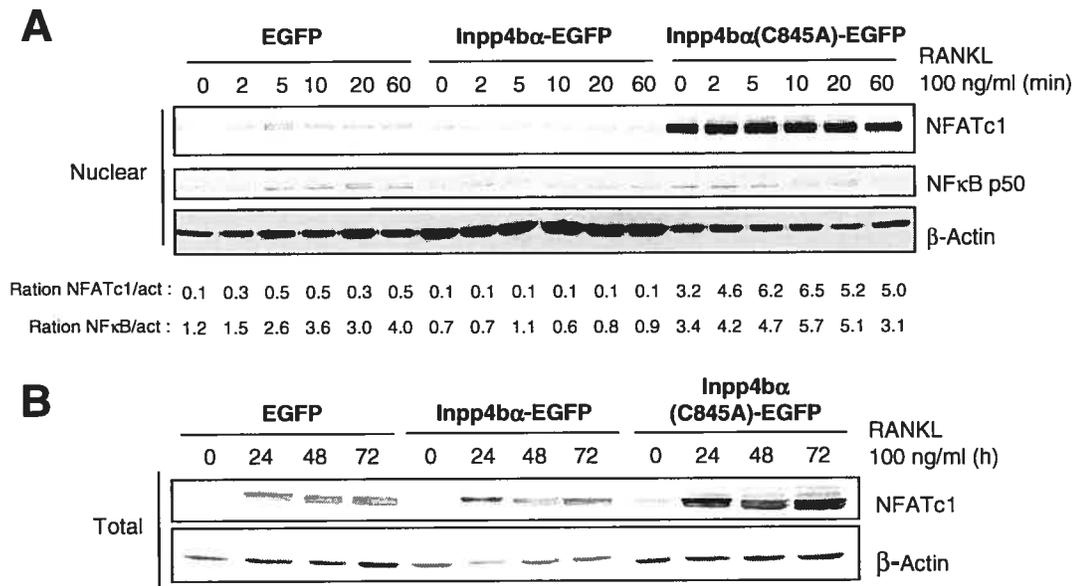
**Figure 2-3. Effect of Inpp4 $\alpha$ -EGFP and Inpp4 $\alpha$ (C845A)-EGFP overexpression on differentiation potential in response to RANKL.**

**A.** Increasing cell numbers were seeded in 96 wells plate and cultured with 10 ng/ml of RANKL for 2 to 5 days. Cells were fixed and stained for TRAP to reveal osteoclast-like cells (bottom panel). Plates were scanned and TRAP staining intensity was quantified using Image Quant software (Upper graphic). **B.** Kinetics of OCLs appearance following increasing days in culture (TRAP staining of rows marked by dotted rectangle in (A)).



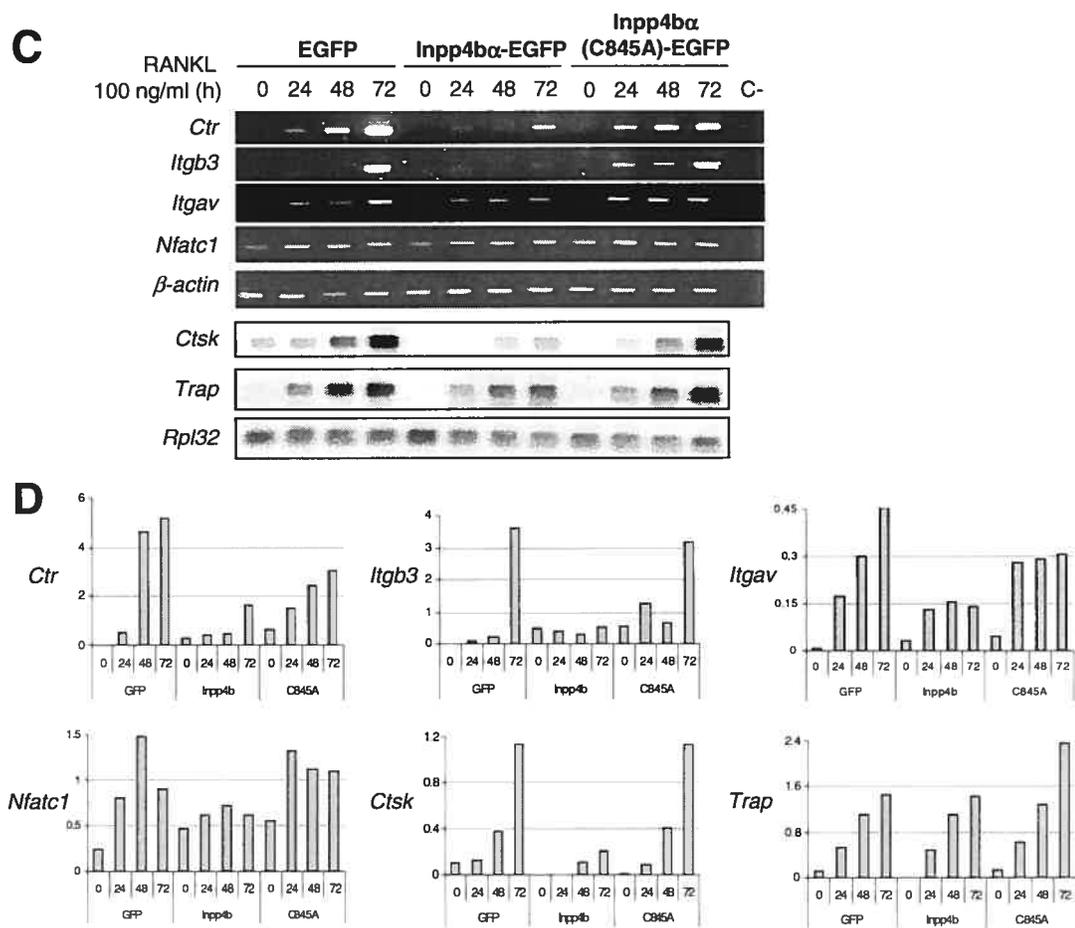
**Figure 2-4. AKT, ERK, p38 and JNK activation by RANKL in Inpp4b $\alpha$ -EGFP and Inpp4b $\alpha$ (C845A)-EGFP overexpressing RAW cells.**

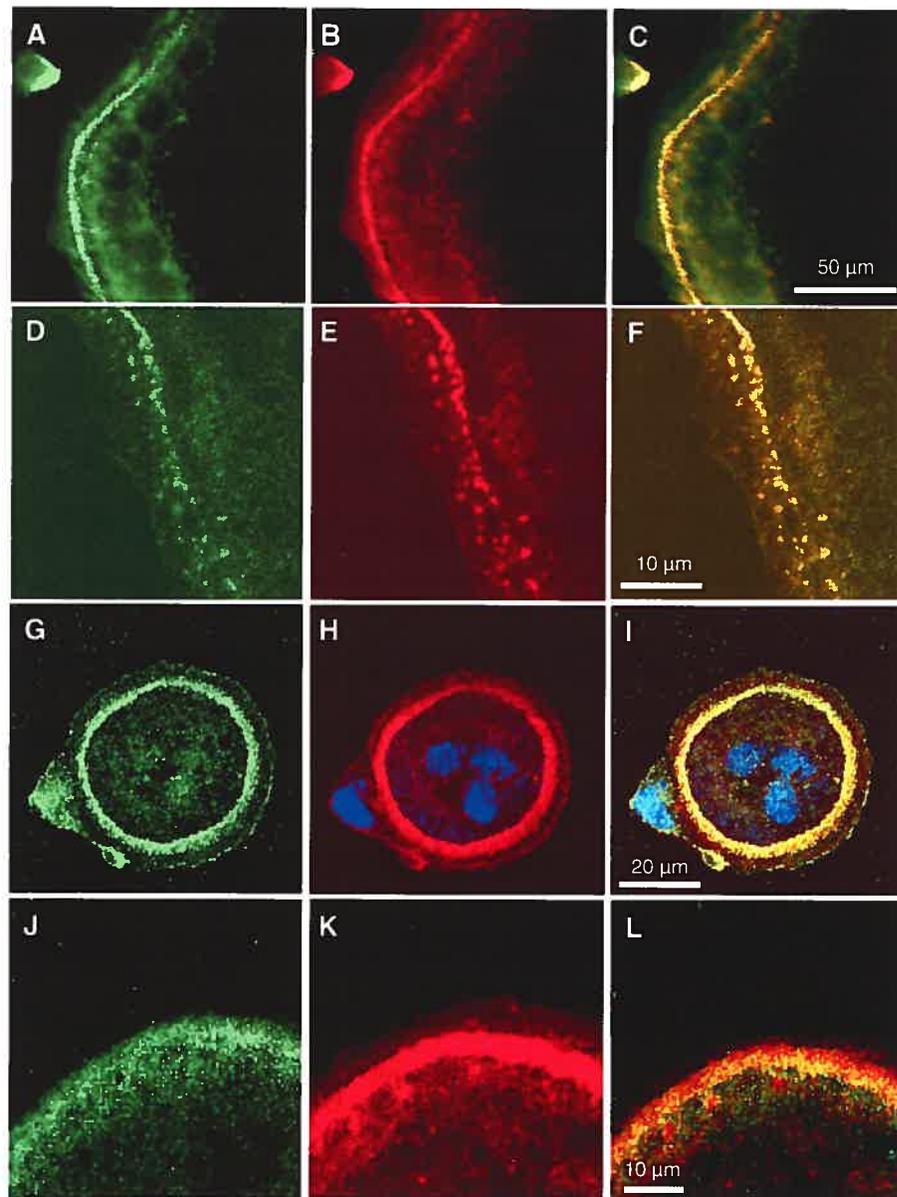
Stable RAW 264.7 clones expressing EGFP (Control), Inpp4b $\alpha$ -EGFP (Inpp4b) or Inpp4b $\alpha$ (C845A)-EGFP, were cultured with 0.5% serum for 24h and stimulated with RANKL (100ng/ml) for the indicated times. Total protein extracts were prepared and Western blot were conducted using phospho-specific (P-) antibodies or antibodies against total AKT, ERK, p38, JNK or Inpp4b. This figure is representative of 3 independent experiments.



**Figure 2-5. Inpp4b $\alpha$  alters the NFATc1 pathway during osteoclast differentiation.**

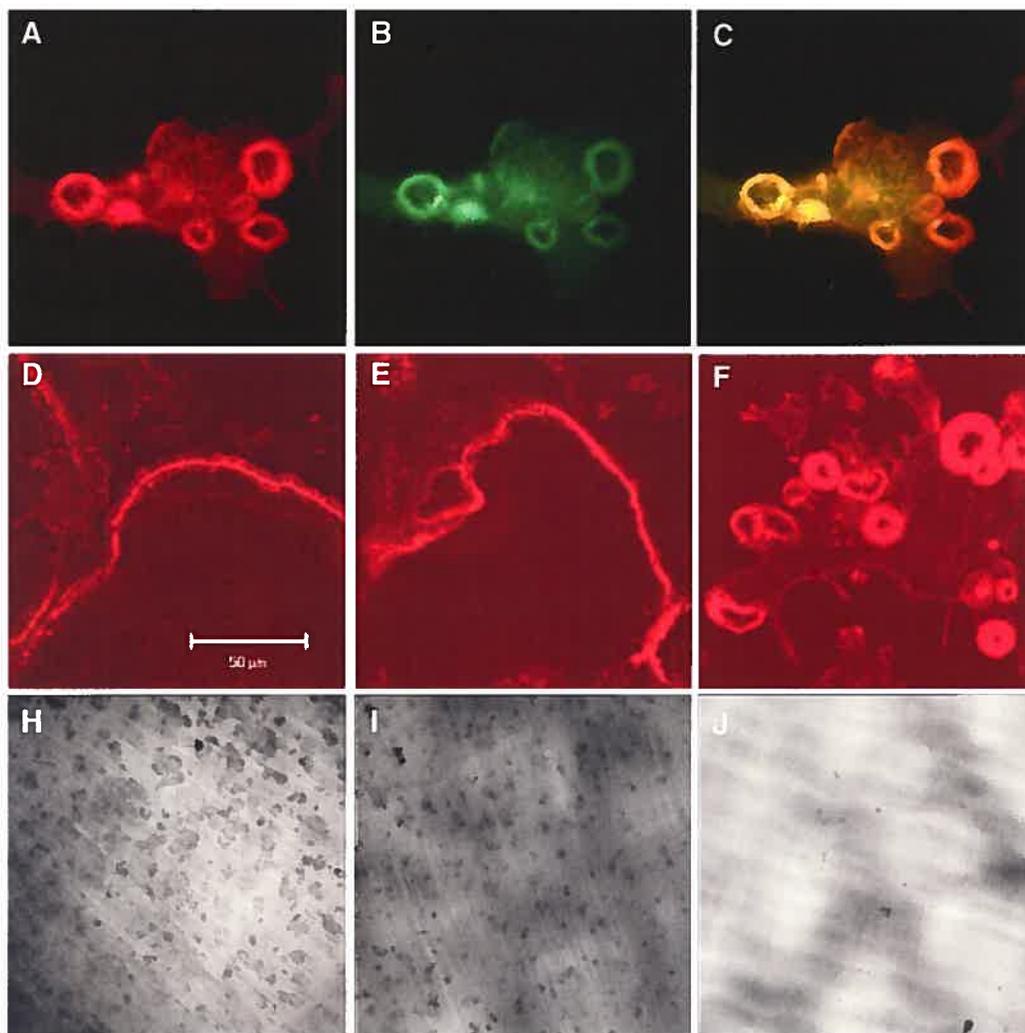
**A.** Stable RAW 264.7 clones expressing EGFP, Inpp4b $\alpha$ -EGFP or Inpp4b $\alpha$ (C845A)-EGFP were cultured with 0.5% serum for 24h and stimulated with RANKL (100ng/ml) for the indicated times. Nuclear protein extracts were prepared and Western blot analysis conducted using antibodies against NFATc1, NF $\kappa$ B p50 and  $\beta$ -actin as internal loading control. Ratio of band intensity (arbitrary units) calculated against  $\beta$ -actin was indicated at bottom. **B.** Stable RAW 264.7 clones expressing EGFP, Inpp4b $\alpha$ -EGFP or Inpp4b $\alpha$ (C845A)-EGFP were cultured in the presence of serum (10%) and of RANKL (100 ng/ml) for the indicated times. Total protein extracts were prepared and Western blot analysis was conducted using antibodies against NFATc1 and  $\beta$ -actin as internal loading control.





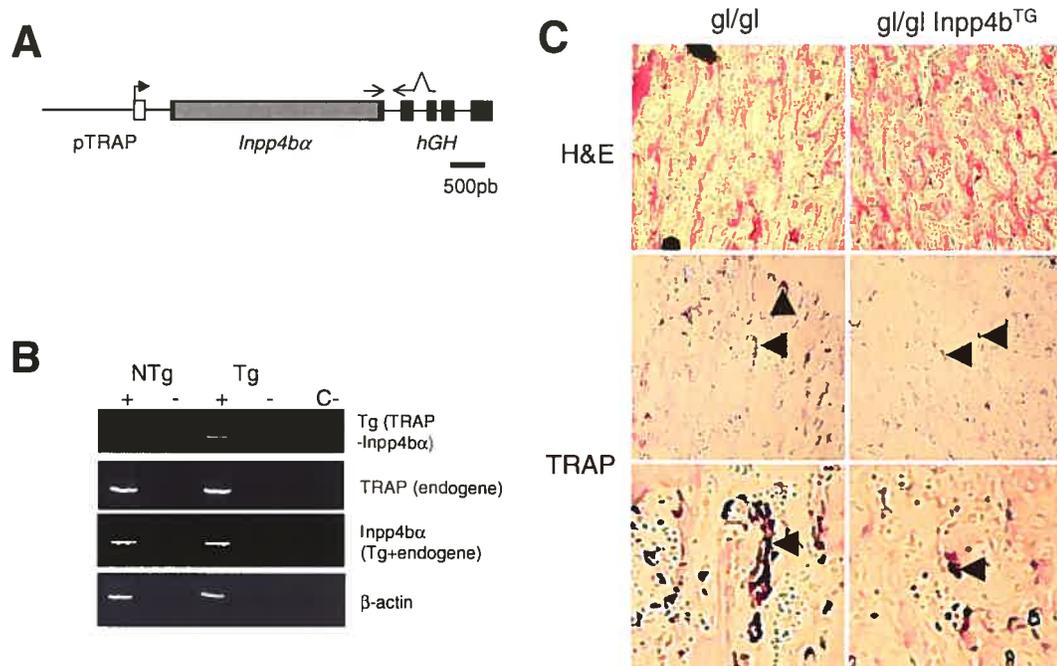
**Figure 2-6. Inpp4b $\alpha$  localization in osteoclasts.**

RAW 264.7 cells stably expressing Inpp4b $\alpha$ -EGFP (A,B,C x20; D,E,F x100) were cultured on glass coverslips in  $\alpha$ -MEM, 10% FBS for 4 days with RANKL (50ng/ml) to generate OCLs. Direct (EGFP, green) or indirect fluorescence following staining with phalloidine-rhodamine (F-actin, red) was analyzed by confocal microscopy. G-L. Bone primary osteoclasts (G,H,I x40; J,K,L x60) were isolated and cultured on glass coverslips for 24 h. Cells were then fixed, permeabilized and labeled with phalloidine-rhodamine (F-actin, red), Topro3 (nucleus, blue) and anti-Inpp4b antibodies followed by secondary FITC-conjugated goat anti-rabbit antibodies (Green). **Left:** EGFP or FITC (Inpp4b); **Middle,** F-actin; **Right.** Merge.



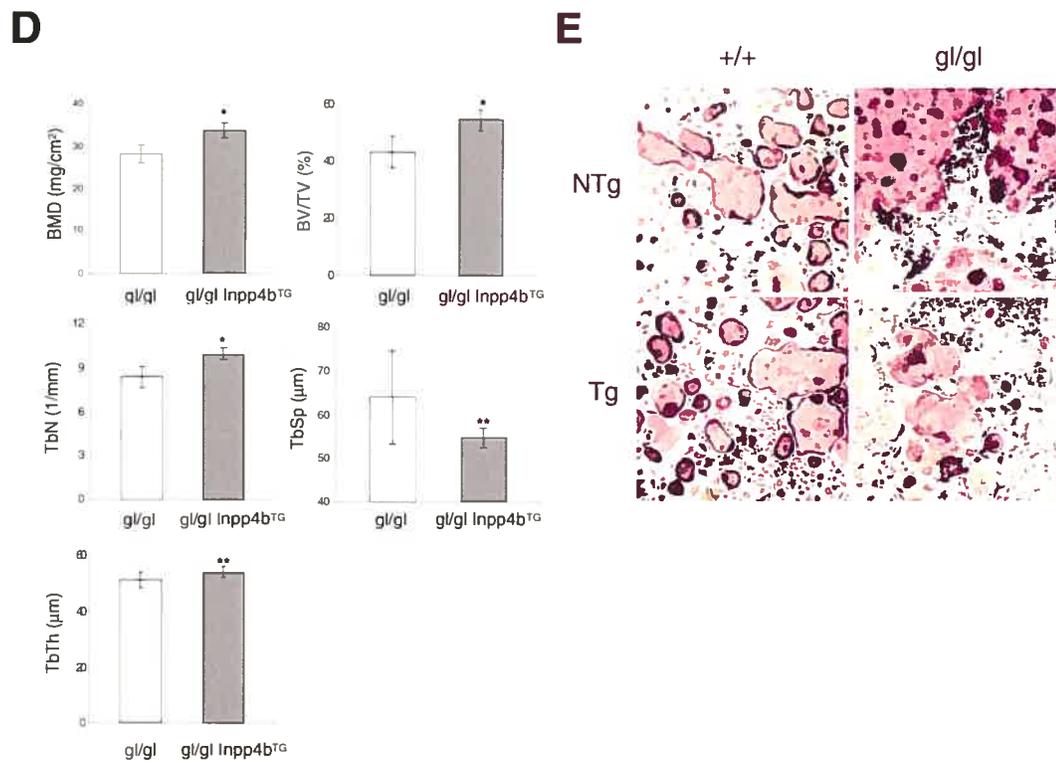
**Figure 2-7. Inpp4b $\alpha$  phosphatase activity is required for podosomes turnover and bone resorption.**

RAW 264.7 cells stably expressing Inpp4b(C845A)-EGFP (A,B,C) were cultured on glass coverslips in  $\alpha$ -MEM, 10% FBS for 4 days with RANKL (50ng/ml) to generate OCLs. Direct (EGFP, green, B) or indirect fluorescence following staining with phalloidine-rhodamine (F-actin, red, A) was analyzed by confocal microscopy. C. Merge picture. Stable RAW 264.7 clones expressing EGFP (D), Inpp4b $\alpha$ -EGFP (E) or Inpp4b $\alpha$ (C845A)-EGFP (F) were cultured on glass coverslips in  $\alpha$ -MEM, 10% FBS for 4 days with RANKL (50ng/ml) to generate OCLs. Cells were fixed, stained for F-actin using phalloidine-rhodamine and immunofluorescence analyzed by confocal microscopy. Equal number of RAW 264.7 cells stably expressing EGFP (H), Inpp4b $\alpha$ -EGFP (I) or Inpp4b $\alpha$ (C845A)-EGFP (J) were seeded on dentine and maintained for 4 days in  $\alpha$ -MEM medium, 10% FBS and RANKL (50ng/ml). Cells were discarded and dentine slices were stained with toluidine blue to reveal resorption pits (x5 magnification).



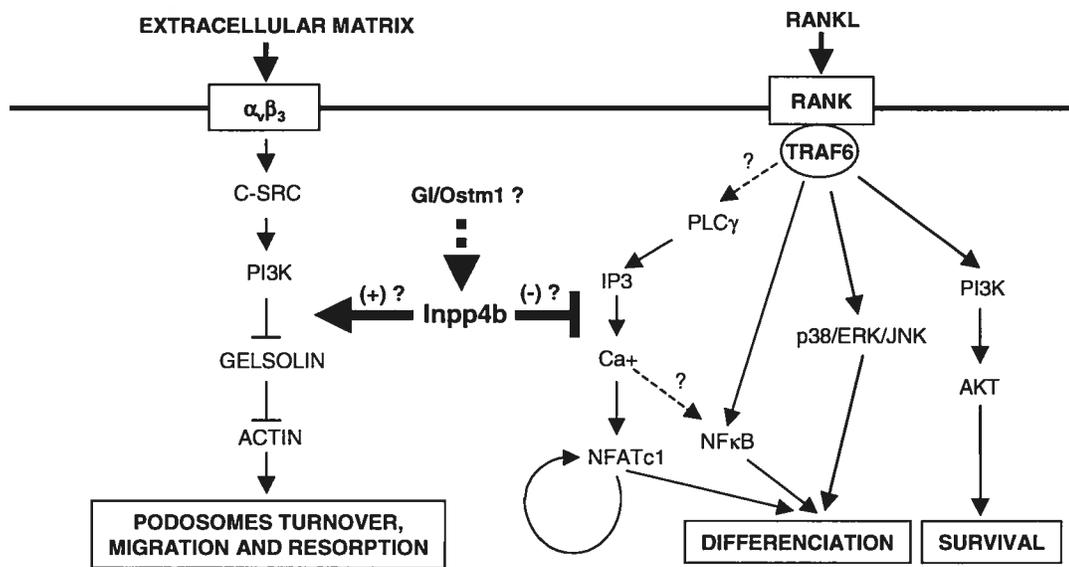
**Figure 2-8. Increased bone density in *gl/gl* TRAP-Inpp4b $\alpha$  transgenic mice.**

**A.** Schematic representation of the transgene construct to target Inpp4b $\alpha$  expression in osteoclasts. pTRAP: 1.8kb mouse tartrate resistant acid phosphatase promoter; Inpp4b $\alpha$ : mouse Inpp4b alpha isoform cDNA; hGH: human growth hormone gene, including 3' region and polyadenylation signal. Arrows indicate the primers position for transgene expression screens. **B.** RT-PCR was performed on OCLs derived from transgenic (Tg) and non-transgenic (NTg) mice bone marrow cells treated with M-CSF (10 ng/ml) and RANKL (50 ng/ml). The expression of the transgene (TRAP-Inpp4b $\alpha$ ) using transgene specific primers. The combined expression of endogenous and transgene Inpp4b $\alpha$  (Tg + endogene) was detected using Inpp4b $\alpha$  specific primers. Expression of endogenous TRAP and  $\beta$ -actin was used as control. **C.** Hematoxylin/eosin (H&E) and TRAP staining of femur sections from *gl/gl* and *gl/gl* TRAP-Inpp4b transgenic (Inpp4b<sup>TG</sup>). Arrowheads point to individual osteoclasts in *gl/gl* and in *gl/gl* Inpp4b<sup>TG</sup>.



**Figure 2-8. (Continued)**

**D.** Significant increase in bone mineral density (BMD) in *gl/gl* Inpp4b<sup>TG</sup> compared to non-transgenic *gl/gl* mice. Bone mineral density (BMD) was quantified using Piximus apparatus. Bone volume percentage (BV/TV), trabecular numbers (TbN), trabecular spacing (TbS) and trabecular thickness (TbTh) were assessed by micro-CT analysis (see also Table 1 and 2). \*  $p < 0.002$ . \*\*  $p < 0.05$ . **E.** *In vitro* OCLs differentiation from wt (+/+) and *gl/gl*, non transgenic (NTg) or transgenic (Tg) splenocytes. Equal number of spleen-derived monocytes was cultured for 6 days with RANKL (50ng/ml) and M-CSF (10ng/ml).



**Figure 2-9.** A schematic model of the novel Inpp4b potential functions in osteoclast differentiation and activation. Dashed arrows indicated uncharacterized molecular mechanism.

**Table 2-1. Microcomputed tomography analysis of femur from control (NTg) and transgenic (Tg), heterozygous (*gl/+*) or grey-lethal homozygous (*gl/gl*) mice.**

	<i>gl/+</i>		<i>gl/gl</i>	
	NTg	Tg	NTg	Tg
BV/TV (%)	5.37 ± 1.38	6.84 ± 0.42	43.28 ± 5.74	54.40 ± 3.44 <sup>a</sup>
Volume (mm <sup>3</sup> )	0.157 ± 0.055	0.185 ± 0.018	0.772 ± 0.138	1.184 ± 0.166 <sup>b</sup>
Surface (mm <sup>2</sup> )	16.02 ± 4.34	18.58 ± 1.43	56.54 ± 11.00	76.90 ± 7.07 <sup>a</sup>
BS/BV (mm <sup>-1</sup> )	104.6 ± 11.5	100.5 ± 2.8	78.57 ± 5.93	66.71 ± 5.42 <sup>c</sup>
Tb.N (mm <sup>-1</sup> )	1.10 ± 0.21	1.39 ± 0.08	8.41 ± 0.74	10.02 ± 0.38 <sup>a</sup>
Tb.Th (μm)	48.49 ± 3.77	49.41 ± 0.12	51.35 ± 2.99	54.30 ± 1.97 <sup>d</sup>
Tb.Sp (μm)	344.65 ± 12.45	298.75 ± 11.53 <sup>c</sup>	63.96 ± 10.73	54.52 ± 2.11 <sup>d</sup>

Data expressed as mean ± SD (*gl/gl* Tg and *gl/gl* NTg : n = 6; *gl/+* NTg and *gl/+* Tg : n = 3)

KEY : BV/TV, bone volume fraction; BS/BV, surface area to volume ratio; Tb.N, trabecular number; Tb.T, trabecular thickness; Tb.Sp, trabecular spacing.

<sup>a</sup>*p* < 0.002, <sup>b</sup>*p* < 0.001, <sup>c</sup>*p* < 0.005, <sup>d</sup>*p* < 0.05 <sup>e</sup>*p* < 0.01 differente from control group value (NTg) as determined by Student *t*-test.

**Table 2-2. Nonmetric microarchitectural indices of femur by microcomputed tomography.**

	<i>gl/+</i>		<i>gl/gl</i>	
	NTg	Tg	NTg	Tg
SMI	2.69 ± 0.18	2.67 ± 0.10	1.15 ± 0.30	0.02 ± 0.46 <sup>a</sup>
TBPF (mm <sup>-1</sup> )	32.38 ± 7.42	30.43 ± 2.01	-20.71 ± 8.64	-41.18 ± 5.73 <sup>a</sup>
DA	4.30 ± 1.93	1.73 ± 1.50	1.15 ± 0.30	2.08 ± 1.12

Data expressed as mean ± SD (*gl/gl* Tg and *gl/gl* NTg : n = 6; *gl/+* NTg and *gl/+* Tg : n = 3)

KEY : DA, geometrical degree of anisotropy; SMI, structure model index; TBPF, trabecular bone pattern factor.

<sup>a</sup>*p* < 0.001, differente from control group value (NTg) as determined by Student *t*-test.

## REFERENCES

1. Gruneberg, H. A new sub-lethal colour mutation in the house mouse. *Proc R Soc Lond (Biol)* 118, 321-342. 1935.
2. Vacher, J. and Bernard, H. 1999. Genetic localization and transmission of the mouse osteopetrotic grey-lethal mutation. *Mamm. Genome* 10:239-243.
3. Chalhoub, N., Benachenhou, N., and Vacher, J. 2001. Physical and transcriptional map of the mouse Chromosome 10 proximal region syntenic to human 6q16-q21. *Mamm. Genome* 12:887-892.
4. 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.
5. Chalhoub, N., Benachenhou, N., Rajapurohitam, V., Pata, M., Ferron, M., Frattini, A., Villa, A., and Vacher, J. 2003. Grey-lethal mutation induces severe malignant autosomal recessive osteopetrosis in mouse and human. *Nat. Med.* 9:399-406.
6. Quarello, P., Forni, M., Barberis, L., Defilippi, C., Campagnoli, M.F., Silvestro, L., Frattini, A., Chalhoub, N., Vacher, J., and Ramenghi, U. 2004. Severe malignant osteopetrosis caused by a GL gene mutation. *J. Bone Miner. Res.* 19:1194-1199.
7. Lacey, D.L., Timms, E., Tan, H.L., Kelley, M.J., Dunstan, C.R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S. *et al.* 1998. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93:165-176.
8. Li, J., Sarosi, I., Yan, X.Q., Morony, S., Capparelli, C., Tan, H.L., McCabe, S., Elliott, R., Scully, S., Van, G. *et al.* 2000. 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.
9. 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. *et al.* 1999. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397:315-323.
10. Darnay, B.G., Haridas, V., Ni, J., Moore, P.A., and Aggarwal, B.B. 1998. Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-kappaB (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF-kappab and c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.* 273:20551-20555.

11. Takayanagi,H. 2005. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J.Mol.Med.* 83:170-179.
12. Blair,H.C., Robinson,L.J., and Zaidi,M. 2005. Osteoclast signalling pathways. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 328:728-738.
13. Wong,B.R., Besser,D., Kim,N., Arron,J.R., Vologodskiaia,M., Hanafusa,H., and Choi,Y. 1999. TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol.Cell* 4:1041-1049.
14. Matsumoto,M., Sudo,T., Saito,T., Osada,H., and Tsujimoto,M. 2000. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL). *J.Biol.Chem.* 275:31155-31161.
15. Lee,S.E., Woo,K.M., Kim,S.Y., Kim,H.M., Kwack,K., Lee,Z.H., and Kim,H.H. 2002. The phosphatidylinositol 3-kinase, p38, and extracellular signal-regulated kinase pathways are involved in osteoclast differentiation. *Bone* 30:71-77.
16. Lee,Z.H., Kwack,K., Kim,K.K., Lee,S.H., and Kim,H.H. 2000. Activation of c-Jun N-terminal kinase and activator protein 1 by receptor activator of nuclear factor kappaB. *Mol.Pharmacol.* 58:1536-1545.
17. Wong,B.R., Josien,R., Lee,S.Y., Vologodskiaia,M., Steinman,R.M., and Choi,Y. 1998. The TRAF family of signal transducers mediates NF-kappaB activation by the TRANCE receptor. *J.Biol.Chem.* 273:28355-28359.
18. Matsuo,K., Owens,J.M., Tonko,M., Elliott,C., Chambers,T.J., and Wagner,E.F. 2000. Fos11 is a transcriptional target of c-Fos during osteoclast differentiation. *Nat.Genet.* 24:184-187.
19. Zambonin-Zallone,A., Teti,A., Grano,M., Rubinacci,A., Abbadini,M., Gaboli,M., and Marchisio,P.C. 1989. Immunocytochemical distribution of extracellular matrix receptors in human osteoclasts: a beta 3 integrin is colocalized with vinculin and talin in the podosomes of osteoclastoma giant cells. *Exp.Cell Res.* 182:645-652.
20. Miyauchi,A., Alvarez,J., Greenfield,E.M., Teti,A., Grano,M., Colucci,S., Zambonin-Zallone,A., Ross,F.P., Teitelbaum,S.L., Cheresch,D. *et al.* 1991. Recognition of osteopontin and related peptides by an alpha v beta 3 integrin stimulates immediate cell signals in osteoclasts. *J.Biol.Chem.* 266:20369-20374.
21. Zambonin-Zallone,A., Teti,A., Carano,A., and Marchisio,P.C. 1988. The distribution of podosomes in osteoclasts cultured on bone laminae: effect of retinol. *J.Bone Miner.Res.* 3:517-523.

22. Destaing,O., Saltel,F., Geminard,J.C., Jurdic,P., and Bard,F. 2003. Podosomes display actin turnover and dynamic self-organization in osteoclasts expressing actin-green fluorescent protein. *Mol.Biol.Cell* 14:407-416.
23. Linder,S. and Aepfelbacher,M. 2003. Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol.* 13:376-385.
24. Nakamura,I., Takahashi,N., Sasaki,T., Tanaka,S., Udagawa,N., Murakami,H., Kimura,K., Kabuyama,Y., Kurokawa,T., Suda,T. *et al.* 1995. Wortmannin, a specific inhibitor of phosphatidylinositol-3 kinase, blocks osteoclastic bone resorption. *FEBS Lett.* 361:79-84.
25. Nakamura,I., Sasaki,T., Tanaka,S., Takahashi,N., Jimi,E., Kurokawa,T., Kita,Y., Ihara,S., Suda,T., and Fukui,Y. 1997. Phosphatidylinositol-3 kinase is involved in ruffled border formation in osteoclasts. *J.Cell Physiol* 172:230-239.
26. Palokangas,H., Mulari,M., and Vaananen,H.K. 1997. Endocytic pathway from the basal plasma membrane to the ruffled border membrane in bone-resorbing osteoclasts. *J.Cell Sci.* 110 ( Pt 15):1767-1780.
27. 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.
28. Bruzzaniti,A., Neff,L., Sanjay,A., Home,W.C., De Camilli,P., and Baron,R. 2005. Dynamin forms a Src kinase-sensitive complex with Cbl and regulates podosomes and osteoclast activity. *Mol.Biol.Cell* 16:3301-3313.
29. Liang,P., Zhu,W., Zhang,X., Guo,Z., O'Connell,R.P., Averboukh,L., Wang,F., and Pardee,A.B. 1994. Differential display using one-base anchored oligo-dT primers. *Nucleic Acids Res.* 22:5763-5764.
30. Xu,J., Smock,S.L., Safadi,F.F., Rosenzweig,A.B., Odgren,P.R., Marks,S.C., Jr., Owen,T.A., and Popoff,S.N. 2000. Cloning the full-length cDNA for rat connective tissue growth factor: implications for skeletal development. *J.Cell Biochem.* 77:103-115.
31. Schwartzberg,P.L., Xing,L., Hoffmann,O., Lowell,C.A., Garrett,L., Boyce,B.F., and Varmus,H.E. 1997. Rescue of osteoclast function by transgenic expression of kinase-deficient Src in src-/- mutant mice. *Genes Dev.* 11:2835-2844.
32. Liang,P., Averboukh,L., and Pardee,A.B. 1993. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Res.* 21:3269-3275.
33. Takumi,T. and Lodish,H.F. 1994. Rapid cDNA cloning by PCR screening. *Biotechniques* 17:443-444.

34. Collin-Osdoby,P., Yu,X., Zheng,H., and Osdoby,P. 2003. RANKL-mediated osteoclast formation from murine RAW 264.7 cells. *Methods Mol.Med.* 80:153-66.:153-166.
35. Hsu,H., Lacey,D.L., Dunstan,C.R., Solovyev,I., Colombero,A., Timms,E., Tan,H.L., Elliott,G., Kelley,M.J., Sarosi,I. *et al.* 1999. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:3540-3545.
36. Coulombe,P. and Meloche,S. 2002. Dual-tag prokaryotic vectors for enhanced expression of full-length recombinant proteins. *Anal.Biochem.* 310:219-222.
37. Denizot,F. and Lang,R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J.Immunol.Methods* 89:271-277.
38. Reddy,S.V., Scarcez,T., Windle,J.J., Leach,R.J., Hundley,J.E., Chirgwin,J.M., Chou,J.Y., and Roodman,G.D. 1993. Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the mouse tartrate-resistant acid phosphatase gene. *J.Bone Miner.Res.* 8:1263-1270.
39. 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. *et al.* 2002. SHIP-deficient mice are severely osteoporotic due to increased numbers of hyper-resorptive osteoclasts. *Nat.Med.* 8:943-949.
40. 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.
41. Norris,F.A., Atkins,R.C., and Majerus,P.W. 1997. The cDNA cloning and characterization of inositol polyphosphate 4- phosphatase type II. Evidence for conserved alternative splicing in the 4-phosphatase family. *J.Biol.Chem.* 272:23859-23864.
42. Jimi,E., Akiyama,S., Tsurukai,T., Okahashi,N., Kobayashi,K., Udagawa,N., Nishihara,T., Takahashi,N., and Suda,T. 1999. Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function. *J.Immunol.* 163:434-442.
43. Takayanagi,H., Kim,S., Koga,T., Nishina,H., Isshiki,M., Yoshida,H., Saiura,A., Isobe,M., Yokochi,T., Inoue,J. *et al.* 2002. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev.Cell* 3:889-901.

44. Ikeda,F., Nishimura,R., Matsubara,T., Tanaka,S., Inoue,J., Reddy,S.V., Hata,K., Yamashita,K., Hiraga,T., Watanabe,T. *et al.* 2004. Critical roles of c-Jun signaling in regulation of NFAT family and RANKL-regulated osteoclast differentiation. *J.Clin.Invest* 114:475-484.
45. Matsuo,K., Galson,D.L., Zhao,C., Peng,L., Laplace,C., Wang,K.Z., Bachler,M.A., Amano,H., Aburatani,H., Ishikawa,H. *et al.* 2004. Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) rescues osteoclastogenesis in precursors lacking c-Fos. *J.Biol.Chem.* 279:26475-26480.
46. Matsumoto,M., Kogawa,M., Wada,S., Takayanagi,H., Tsujimoto,M., Katayama,S., Hisatake,K., and Nogi,Y. 2004. Essential role of p38 mitogen-activated protein kinase in cathepsin K gene expression during osteoclastogenesis through association of NFATc1 and PU.1. *J.Biol.Chem.* 279:45969-45979.
47. Battaglino,R., Kim,D., Fu,J., Vaage,B., Fu,X.Y., and Stashenko,P. 2002. c-myc is required for osteoclast differentiation. *J.Bone Miner.Res.* 17:763-773.
48. Boyce,B.F., Wright,K., Reddy,S.V., Koop,B.A., Story,B., Devlin,R., Leach,R.J., Roodman,G.D., and Windle,J.J. 1995. Targeting simian virus 40 T antigen to the osteoclast in transgenic mice causes osteoclast tumors and transformation and apoptosis of osteoclasts. *Endocrinology* 136:5751-5759.
49. Golden,L.H. and Insogna,K.L. 2004. The expanding role of PI3-kinase in bone. *Bone* 34:3-12.
50. Norris,F.A., Auethavekiat,V., and Majerus,P.W. 1995. The isolation and characterization of cDNA encoding human and rat brain inositol polyphosphate 4-phosphatase. *J.Biol.Chem.* 270:16128-16133.
51. Munday,A.D., Norris,F.A., Caldwell,K.K., Brown,S., Majerus,P.W., and Mitchell,C.A. 1999. The inositol polyphosphate 4-phosphatase forms a complex with phosphatidylinositol 3-kinase in human platelet cytosol. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:3640-3645.
52. Vyas,P., Norris,F.A., Joseph,R., Majerus,P.W., and Orkin,S.H. 2000. Inositol polyphosphate 4-phosphatase type I regulates cell growth downstream of transcription factor GATA-1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:13696-13701.
53. Ivetac,I., Munday,A.D., Kisseleva,M.V., Zhang,X.M., Luff,S., Tiganis,T., Whisstock,J.C., Rowe,T., Majerus,P.W., and Mitchell,C.A. 2005. The type Ialpha inositol polyphosphate 4-phosphatase generates and terminates phosphoinositide 3-kinase signals on endosomes and the plasma membrane. *Mol.Biol.Cell* 16:2218-2233.

54. Shin,H.W., Hayashi,M., Christoforidis,S., Lacas-Gervais,S., Hoepfner,S., Wenk,M.R., Modregger,J., Uttenweiler-Joseph,S., Wilm,M., Nystuen,A. *et al.* 2005. An enzymatic cascade of Rab5 effectors regulates phosphoinositide turnover in the endocytic pathway. *J.Cell Biol.* 170:607-618.
55. 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.
56. Shigemura,N., Akashi,A., and Nakagiri,T. 2002. Intrathoracic extramedullary hematopoiesis arising in marble bone disease. Clarifying the genetic disease mechanism. *Jpn.J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 50:311-314.
57. 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.
58. Berridge,M.J., Lipp,P., and Bootman,M.D. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 1:11-21.
59. Hruska,K.A., Rolnick,F., Huskey,M., Alvarez,U., and Cheresch,D. 1995. Engagement of the osteoclast integrin alpha v beta 3 by osteopontin stimulates phosphatidylinositol 3-hydroxyl kinase activity. *Endocrinology* 136:2984-2992.
60. Chellaiah,M., Fitzgerald,C., Alvarez,U., and Hruska,K. 1998. c-Src is required for stimulation of gelsolin-associated phosphatidylinositol 3-kinase. *J.Biol.Chem.* 273:11908-11916.
61. 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.
62. Buccione,R., Orth,J.D., and McNiven,M.A. 2004. Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 5:647-657.

**CHAPITRE 3. CLONAGE ET CARACTÉRISATION DU GÈNE MURIN  
CODANT POUR L'INOSITOL POLYPHOSPHATE 4-PHOSPHATASE DE  
TYPE II**

### 3.1. MISE EN SITUATION.

Les études présentées dans le chapitre 2 suggèrent un rôle pour Inpp4b dans la différenciation et la fonction des ostéoclastes. Nos travaux permettent pour la première fois d'impliquer la protéine Inpp4b $\alpha$  dans un processus biologique. Comme le gène *Inpp4b* n'avait pas encore été caractérisé chez la souris, l'objectif de ce deuxième article était d'étudier plus en détails la structure génomique, l'expression tissulaire et le promoteur d'*Inpp4b*. Cette étude nous a permis également d'identifier un nouvel isoforme d'Inpp4b chez la souris et de déterminer la localisation subcellulaire de l'isoforme transmembranaire d'Inpp4b, Inpp4b $\beta$ . Cette étude, qui met en lumière la complexité structurale d'Inpp4b chez les mammifères, avait aussi pour but de déterminer l'approche la plus efficace afin d'induire l'inactivation de ce gène chez la souris (voir chapitre 5).

### 3.2. ARTICLE 2.

#### CHARACTERIZATION OF THE MURINE INPP4B GENE AND IDENTIFICATION OF A NOVEL ISOFORM

MATHIEU FERRON\* ET JEAN VACHER\*&

Institut de recherches cliniques de Montréal, Programme de biologie moléculaire  
Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal, &Faculté de Médecine de  
l'Université de Montréal.

Soumis à *Gene* le 20 décembre 2005.

Contribution des auteurs :

Mathieu Ferron : Ensemble de l'étude, participation à la rédaction du manuscrit sous la supervision du Dr Jean Vacher.

Jean Vacher : Supervision scientifique et rédaction du manuscrit.

## ABSTRACT

Inositol polyphosphate phosphatases have been associated with major cellular functions as cell growth, differentiation, apoptosis and motility. To further characterize the role of these proteins in cell physiology, we have isolated the mouse Inositol polyphosphate 4-phosphatase type II (*Inpp4b*) cDNA. The 928aa murine Inpp4b protein is 96 and 90% identical to the rat and human proteins respectively, includes a conserved C2, a consensus phosphatase catalytic site domain and encodes two ( $\alpha$  and  $\beta$ ) isoforms. The *Inpp4b* mouse gene is highly conserved with the human *INPP4B* homologue and was genetically mapped on mouse chromosome 8 in region of synteny with the human Chr 4q27-31 interval. Analysis demonstrated strong specific expression of Inpp4b isoforms compared to Inpp4a isoforms, with Inpp4b alpha being highly expressed in hematopoietic tissues and cells. Interestingly, we characterized a novel spliced isoform of Inpp4b that lacks a part of the C2 domain. We also report here that Inpp4b $\beta$  colocalizes with the Golgi apparatus, suggesting a different cellular function for this isoform. Our characterization of the murine Inpp4b gene sets the basis for further functional studies *in vivo*.

## INTRODUCTION

Phosphatidylinositol lipids or phosphoinositides are implicated in major cellular mechanisms including cell differentiation, growth, motility and apoptosis [1]. Acting as second messengers, their intracellular concentration levels are tightly regulated by the opposite activities of phosphoinositide kinases and phosphatases [2]. Phosphoinositides can be reversibly phosphorylated at three distinct positions, D-3, D-4 and D-5 of the inositol head group, generating 7 unique derivatives that act as second messengers. Specifically upon recruitment and activation at the membrane, the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-Kinase) is responsible for the production of phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>) from the substrate phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) [1]. Subsequent to this modification, newly synthesized PI(3,4,5)P<sub>3</sub> will be rapidly dephosphorylated by specific inositol phosphatases [3]. PI(3,4,5)P<sub>3</sub> can be dephosphorylated at the D-3 position by PTEN to generate PI(4,5)P<sub>2</sub> [4] or at the D-5 position by SHIP, an inositol polyphosphate 5-phosphatase, that generate the PI(3,4,)P<sub>2</sub> second messenger [5]. The inositol polyphosphate 4-phosphatase isoenzymes type I (Inpp4a) and type II (Inpp4b) are then responsible for the dephosphorylation of the D-4 position on the inositol ring to generate PI(3)P [6;7].

Two human and rat 4-phosphatase isoenzymes (type I or INPP4A, and type II or INPP4B) have been identified, sharing 37% amino acid identity. Both isoenzymes contain a catalytic "CX<sub>5</sub>R" motif found in protein tyrosine phosphatases and dual specificity protein/lipid phosphatases. INPP4A and INPP4B can both exist in two splice variants,  $\alpha$  and  $\beta$  [6;7]. While the INPP4A $\alpha$  and INPP4B $\alpha$  isoforms present a hydrophilic C-terminus tail, the INPP4A $\beta$  and INPP4B $\beta$  isoforms have a hydrophobic C-terminus, which potentially contains one transmembrane domain. At present, no in vivo functional role has been assigned to Inpp4b, and only few studies on Inpp4a have been accomplished. Inpp4a can form a complex with PI3Kinase in human platelets that become translocated to the actin cytoskeleton after thrombin

stimulation [8]. In megakaryocytes, Inpp4a represents a potential negative regulator of cell growth acting downstream of the GATA-1 transcription factor [9]. The mouse mutant *weeble* that corresponds to a null allele of Inpp4a, demonstrated a crucial role for this phosphatase in neuronal survival [10]. Importantly, Inpp4a activity is not only required to terminate a signaling pathway by down-regulating PI3 kinase second messenger PtpIns(3,4)P<sub>2</sub> at the plasma membrane, but also to generate PI(3)P on endosomal membrane downstream of Rab5, participating in phosphoinositides turnover in the endocytic pathway [11;12].

To further characterize the distinct role of Inpp4b in mammals, we report here the isolation of the cDNA that encodes the mouse Inpp4b protein. Inpp4b gene and protein structures analysis demonstrated high conservation with the human and rat Inpp4b $\alpha$  and  $\beta$  spliced isoforms. The murine Inpp4b locus was genetically and physically localized on chromosome 8, in a syntenic region on human 4q27-31 chromosome. For the first time, we have also characterized the individual expression profiles of each of the four Inpp4 isoforms, Inpp4 $\alpha$ , $\beta$  and Inpp4b $\alpha$ , $\beta$ . Interestingly, we identified and characterized a novel Inpp4b splicing variant called Inpp4b alpha short (Inpp4b $\alpha$ s) resulting from exon 5 skipping. The localization of Inpp4b $\beta$  at the Golgi is also reported.

In summary, our studies describe the characterization and expression analysis of three murine Inpp4b isoforms and provide the basis toward functional studies to decipher the role of Inpp4b *in vivo* in mouse.

## EXPERIMENTAL

### cDNA cloning of *Inpp4b*

To isolate the mouse *Inpp4b* cDNA, a C57BL/6 spleen cDNA mouse library LambdaZapII (Stratagene) was screened by PCR [13]. Alignment of the rat *Inpp4b* sequence with mouse EST and TRACE databases sequences (www.ncbi.nlm.nih.gov) served to design specific primers for mouse *Inpp4b* cDNA. The sequence of the TRACE 8258396 was used for the forward primer 5'-AAGCTTCCTGGGCTGTGCCAG-3' and the EST BG145663 for the reverse primer 5'-GTGATGACATCATAGAGAGC-3'. This assay, when tested on mouse spleen cDNA, amplified a 669 bp cDNA specific fragment, and 6 different cDNA clones were sequenced. One of them, sP4D12 was found to contain the complete open reading frame of *Inpp4b* except for 250 pb in the 5' region of the cDNA. Consequently, the 5' half of the coding sequence was amplified by RT-PCR amplification on spleen cDNA with the forward primer 5'-AACCGGAGCTCATTATTTGGTACCATTTG-3' and the reverse primer 5'-CTCTGTGCTGACATTAGGAG-3'. The amplified product was digested by KpnI and SacI restriction enzymes to obtain a 1389 bp fragment (5' half) and cloned with the 1507 bp SacI/BglII fragment (3' half) obtained from sP4D12 clone in pBlueScript in order to reconstitute a 2890 bp fragment containing the complete 2781 bp open reading frame of *Inpp4b*.

### Chromosomal mapping

The mouse chromosomal location of *Inpp4b* was determined by a PCR amplification of the BSS mapping panel at The Jackson Laboratory [14] with the primers designed from a (GATA)<sub>n</sub> repeat found in the mouse *Inpp4b* intron 2 sequence. Each genomic DNA samples (25 ng) were amplified using flanking primer (forward : 5'-TGGATACAGCCCAATGAGTTG-3', reverse : 5'-TCCCTTCTGTCATAGGTAGG-3'). Genotype of each animal for the GATA repeat was determined based on the length of the PCR product : ~260 pb for *Mus musculus*

(C57BL/6J) and ~250pb *Mus spretus*. The results were analyzed with the Map Manager program in The Jackson Laboratory Backcross DNA Map Service.

### **Transcription start site and promoter analysis**

Reverse transcription (RT) reaction were carried out on total RNA isolated from muscle, spleen, heart, lung, thymus and brain using the p32 radiolabeled primer : 5'-GACTTTCCTGCGTTCTCCAG-3' as described [15]. The RT reaction were then run on a 6% acrylamide sequencing gel adjacent to a promoter-exon 1 region sequence reaction made with the same primer. To identify conserved putative transcription factor binding sites, the mouse and the human promoter region sequence were analyzed using the Consite website (<http://mordor.cgb.ki.se/cgi-bin/CONSITE/consite/>).

### **Expression analysis by RT-PCR and by Western blot**

Total RNA extracted from tissues and hematopoietic cells of C57BL/6 mice were subjected to RT-PCR using primers specific for Inpp4a $\alpha$  and Inpp4a $\beta$  : forward 5'-AGCCTGTCCTCTTCAACGTG-3', alpha reverse 5'-TGCATATTTGCGACTTCCAAC-3' and beta reverse 5'-ACGCTATGCTCAGAAAGAGC-3', and for Inpp4b $\alpha$  and Inpp4b $\beta$  : forward 5'-GATTAAAGAAGGCCAGTTGC-3', alpha reverse 5'-ACTTGGGGAAAGCCCATCAGC -3' and beta reverse 5'-AGAAGTGTCGAGAAGTTGGC-3'. Total proteins extracts were prepared from tissues of C57BL/6 mice and analyzed by Western blotting were conducted as described [16]. Blots were probed with an Inpp4b rabbit polyclonal purified antiserum developed in our laboratory, which recognizes Inpp4b amino acid 2-235.

### **Identification of the Inpp4b $\alpha$ s isoform**

One Inpp4b cDNA clone isolated in our screen was lacking exon 5. A RT-PCR essay using primers in exon 3 and in exon 8 was designed to confirm this result on tissues total RNA. The primers were the following: exon3-forward 5'-

AACCGGAGCTCATTATTTGGTACCATTTG-3' and exon8-reverse 5'-GGCACAGCCCAGGAAGCTTC-3'. Two bands (555 pb and 436 pb) were obtained in multiple tissues, isolated and sequenced. The only difference found between the two PCR products was that the 436 bp band lacks the exon 5 as the original cDNA clone.

#### **Inpp4b-GFP fusion proteins constructs**

Full-length cDNA encoding mouse Inpp4b $\alpha$  without the stop codon was generated by PCR using tailed oligonucleotides to generate KpnI and XmaI restriction sites : forward 5'-AATTGGTACCATTTGAAAAAGACATCGTGG-3' reverse 5'-AATTC~~CCCGGG~~TGTCAGCTTTTCCATAAG-3'. The PCR product was digested and cloned into the expression pEGFP-N1 vector (Clontech) to generate pInpp4b $\alpha$ -EGFP. The cDNA encoding the alpha-short isoform, lacking the exon 5, was amplified and cloned with the same primers to generate pInpp4b $\alpha$ s-EGFP. To generate the pInpp4b $\beta$ -EGFP construct, pInpp4b $\alpha$ -EGFP was digested by BtrI and AgeI to remove the 3' alpha coding region that was replaced by the Inpp4b $\beta$  3' coding region amplified with the following primer and digested by BtrI and AgeI : forward 5'-CATGGCAGTCGGCATTTCAG-3' reverse 5'-GATCACCGGTTGGTATTTGGCTAAGAGTAATG-3'.

#### **Cell culture, transfection and immunofluorescence**

COS-7 ( $1 \times 10^5$ ) cells were plate on glass cover slips in six well culture plate and growth in DMEM media supplemented with 10% FBS. After 24h, cells were transfected with 0.5  $\mu$ g of plasmid DNA using Lipofectamine2000 (Invitrogen). After 48h, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min, permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 15 min, washed in PBS, and incubated with 10% fetal bovine serum in PBS for 30 min. Cells were then labeled with a 1:100 dilution of anti-Golgin 97 mouse monoclonal antibody (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) containing 10% fetal bovine serum for 60 min. After washing with PBS containing 10% fetal bovine

serum, cells were stained with an Alexa Fluor<sup>®</sup> 546-conjugated goat anti-mouse secondary antibody (Molecular Probes). Nuclei were stained with TO-PRO<sup>®</sup> 3 (Molecular Probes). Cells were visualized by confocal microscopy (Zeiss) at 488 nm (EGFP), 543 nm (Alexa Fluor<sup>®</sup> 546) and 633 nm (TO-PRO<sup>®</sup> 3).

### **Phospholipids binding assay**

To characterize Inpp4b lipid binding specificity, the C2-domain of mouse Inpp4b protein (aa 2 to 235) was amplified by PCR with the primers : forward 5'-CCGCCTCGAGTGAAATCAAAGAGGAAGG-3' and reverse 5'-CAGACTCGAGACAGGATTCCTTAAGACTG3' including a XhoI site. The amplification product was digested and cloned into the XhoI site of the pHGST.2T bacterial expression vector [17]. Following induction and expression in BL21 cells, the HisX6-Inpp4b(2-235)-GST recombinant fusion protein was purified using GST purification module (Amersham). The Inpp4b-C2 recombinant protein was released from GST following thrombin treatment. A panel of lipid spotted onto nitrocellulose membrane (PIP-Strips<sup>™</sup>, Echelon bioscience inc., UT) was preincubated 1hr in TBS-T (Tris 10mM, 150 mM NaCl, pH 8, 0.1% Tween-20) containing 0.1% ovalbumin, followed by incubation with Inpp4b-C2 recombinant protein (0.05 µg/ml) for 4hr. Membrane were washed 3 times in the same buffer and incubated with anti-Inpp4b rabbit polyclonal purified antiserum (1:5000) for 1 hr, followed by incubation with anti-rabbit-HRP (1:1000).

### **Mouse and human Inpp4b gene structure**

In order to determine the exon-intron boundaries, mouse and human cDNA were aligned with the mouse and the human genomic sequence respectively using NCBI Blast program ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

## RESULTS

### **The murine *Inpp4b* cDNA and gene organization**

To characterize the murine *Inpp4b* protein, we decided to isolate the murine *Inpp4b* gene. Alignment of the rat *Inpp4b* cDNA sequence with mouse EST et TRACE databases sequences (www.ncbi.nlm.nih.gov) allowed us to design murine specific primers. These oligonucleotides were used to screen by PCR a C57BL/6 spleen cDNA mouse library. The full length *Inpp4b* cDNA was sequenced and encodes a 928 amino-acids protein with a conserved Cys(X)<sub>5</sub>Arg phosphatase active site (Fig 3-1). After alignment of the mouse cDNA with the genomic sequence, exon-intron boundaries were identified by consensus donor and acceptor signals in accordance with GT/AG rule (Table 3-1). *Inpp4b* gene is composed of 25 exons, including two 5' untranslated exons and 23 coding exons with length ranging from 45 to 1340 nucleotides long and intron size that vary from 1,1 kb to more than 280 kb. The entire murine *Inpp4b* locus covers approximately ~600kb of genomic DNA. We then deduced the organization of the human *INPP4B* locus and demonstrated a very high conservation with the mouse gene including the alternative splicing of exon 25, which generate the two INPP4B protein  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms (Table 3-2, Fig 3-1B and Fig 3-5B). Remarkably, all the internal coding exons have identical length in mouse and human, with the exception of the exon 17 that is 9 bp shorter in human. This difference result in a change in the length of the human INPP4B protein, that lacks 3 residues versus the rat and the mouse protein in a non-conserved region between amino acids 549 and 571 (Fig 3-1A).

### **Mapping of the mouse *Inpp4b* gene**

To genetically map the *Inpp4b* locus in mouse, we took advantage of a microsatellite (GATA)<sub>n</sub> repeat polymorphism that we characterized in mouse *Inpp4b* intron 2 sequence. A specific PCR assay was designed to genotype at the locus 94 progenies generated from the C57BL/6 x Spretus (BSS) interspecific backcross panel developed at the Jackson's Laboratory. Genotyping screen defined two recombination events

and localized *Inpp4b* on mouse Chromosome 8 in a 2.2 cM genetic interval, between the microsatellite marker D8Mit74 and the *man2b1* gene (Fig 3-2A). This mouse genetic interval is syntenic to the human 4q27-31 region closed to the *Gypa* locus, near a break of synteny with human chromosome 19p (Fig 3-2B). Comparison of the two physical maps corresponding to these genomic intervals revealed a perfect conservation in genes order and transcription orientation in mouse and human, with the murine *Inpp4b* locus being localized in 1 Mb interval between the *Il15* and *Usp38* genes (Fig 3-2C).

### **Transcription start site and promoter analysis of the murine *Inpp4b* gene**

To further characterize the *Inpp4b* locus, the identification of the transcription start site of *Inpp4b* gene was undertaken by primer extension. We used as template total RNA isolated from different adult mouse tissues RNA (Fig 3-3). Interestingly, we mapped three different tissue-specific transcription start sites for *Inpp4b* specific for skeletal muscle (SM), heart (H) and spleen-lung-thymus (SLT). Relatively to exon 1, the skeletal muscle start site is the more proximal while the heart-specific (-300) is the more distal. The third initiation site common to spleen, lung and thymus was mapped at -64 (Fig 3-3). Analysis of the upstream sequences of the 3 start sites suggests that they are subjected to control of TATA-less promoters. Accordingly, two SP1 consensus binding site, usually find in TATA-less promoter, were detected between -140 and +104. Sequence analysis of the promoter region defined several consensus sequences for other known transcriptional binding sites conserved between mouse and human (Fig 3-3B). More specifically, conserved ETS, GKLF, SP1, c-Myb, AP-2alpha, MEF-2, NF- $\kappa$ B and GATA binding sites were identified downstream and up-stream of the three initiation site in the -347 to +313 region.

### ***Inpp4* expression pattern**

To establish the expression pattern of the transcripts encoding *Inpp4b* $\alpha$  and  $\beta$  isoforms in mouse tissues and compared it with expression of *Inpp4a* $\alpha$  and  $\beta$  isoforms, semi-quantitative RT-PCR analysis was undertaken in a panel of mouse

tissues (Fig 3-4A). *Inpp4a $\alpha$*  and *Inpp4b $\alpha$*  isoforms are widely expressed and they are detected at various levels in all tested tissues. While *Inpp4a $\beta$*  is expressed in most of the tissues tested, the *Inpp4b $\beta$*  isoform displays a more restricted expression pattern, been only detected in brain, heart, intestine, skeletal muscle and spleen. This tissue specificity is further emphasized in enriched cell populations from hematopoietic origin including osteoclasts (Fig 3-4B and Ferron *et al.* unpublished data). In fact, only the *Inpp4b* alpha isoform is highly expressed in B, NK and mast cells (Fig 3-4B). In addition, low expression is present in T cells, but is undetectable in mature peritoneal macrophage cell population. Importantly, the expression of *Inpp4b* beta isoform and of the  $\alpha$  and  $\beta$  *Inpp4a* isoforms is undetectable or very low in these cells. This result suggests that *Inpp4b* alpha isoform is specific to these hematopoietic lineages.

Tissue expression of Inpp4b was further confirmed at the protein level using a specific Inpp4b antibody in Western blot analysis (Fig 3-4C). We developed this antibody against the N-terminal end of Inpp4b that could recognize both Inpp4b alpha and beta isoforms. As expected, a 105kDa protein was detected both in multiple tissues and in COS cells transfected with the *Inpp4b $\alpha$*  cDNA. The Inpp4b protein is highly expressed in brain tissue as previously established at the RNA level. Lower protein expression is present in several mouse tissues including spleen, lung, testis and small intestine, in accordance with the RNA expression profile established by RT-PCR (Fig 3-4A and 3-4C).

### **The mouse Inpp4b proteins and their homologues**

The mouse *Inpp4b $\alpha$*  cDNA encodes a 928 amino acids protein with a predicted molecular weight of 105kDa. The mouse protein shares 96% and 90% identity at the amino acid level with the human and rat proteins respectively (Fig 3-1A and 3-5A) In addition, the mouse paralogues Inpp4a and Inpp4b are highly similar and share 45% amino acid identity (Fig 3-5A). Using NCBI conserved domain search (rpsblast) we

determined that all mammalian Inpp4 proteins share known conserved domains including C2, as well as the Cys(X)<sub>5</sub>Arg phosphatase active site. Database search allowed us to find that these proteins are phylogenetically related with *Caenorhabditis elegans* 4-ptase and *Drosophila melanogaster* CG1846 (Fig 3-5A). However, the presence of a plekstrin homology (PH) domain in the *C. elegans* protein, instead of the C2 domain found in the other related proteins, is indicative of convergent evolution of this part of the protein as both C2 and PH domain have been implicated in membrane lipid binding [18]. Interestingly, the *D. melanogaster* Inpp4 orthologue contain both a C2 and a PH domain and surprisingly the *D. melanogaster* PH domain is not related to the *C. elegans* PH domain. Duplication of Inpp4 genes (Inpp4a and Inpp4b) and presence of an alternative splicing that generate the beta isoform are only found in vertebrates, as only one *Inpp4* gene is present in lower metazoans (*C. elegans* and *D. melanogaster*). In addition, we fail to identify any yeast Inpp4 orthologues, suggesting that this gene family as evolved with multicellular organisms.

#### **The Inpp4b C2 domain bind specific lipid**

Since it was demonstrated that several C2 domains can bind lipids and can serve as module to recruit proteins at particular intracellular membrane [19;20], we investigated whether Inpp4b C2 domain could have lipid binding specificity. Using an *in vitro* lipid-binding assay, we demonstrated that Inpp4b-C2 domain preferentially binds to phosphatidic acid and phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PI(3,4,5)P3) (Fig 3-5C). In addition the Inpp4b-C2 domain also binds other phosphorylated PI and phosphatidyl serine, but with a lower affinity.

#### **Characterization of a novel Inpp4b isoform : Inpp4b $\alpha$ s**

Among several Inpp4b cDNA clones we isolated, one of them was found to contain all Inpp4b exons except exon 5 (Fig 3-6A). RT-PCR conducted on mouse tissues RNA confirmed the existence of this new spliceoform *in vivo*. With a single pair of primers localized upstream of the start codon in exon 3 and in exon 8 respectively,

two specific amplified products of 461 and 342 bp respectively were detected (Fig 3-6B). The sequences of these two products demonstrated lack of exon 5 sequence (119bp) resulting from alternative splicing and generating a shorter cDNA, *Inpp4b $\alpha$ s* (*Inpp4b $\alpha$  short*), compared to the *Inpp4b $\alpha$*  native form (Fig 3-6A, C and D). These two RT-PCR products were also widely detected in mouse tissues but in different proportion and only the larger form was detected in brain, suggesting a specific regulation in this tissue (Fig 3-6B). Because the exclusion of exon 5 in *Inpp4b $\alpha$ s* results in a frame shift and in a premature stop codon in exon 6 if the original start codon is used, we hypothesize that an alternative downstream start codon was used for the translation of the *Inpp4b $\alpha$ s* messenger (Fig 3-6C and D). The resulting protein is predicted to be 865 aa long, with a predicted molecular weight of 98 kDa. To confirm that the *Inpp4b $\alpha$ s* messenger is translated in a functional protein we fused the *Inpp4b $\alpha$ s* C-terminus to EGFP in a expression plasmid. The resulting fusion protein species were characterized by Western blot following transfection in COS cells. Anti-EGFP and anti-*Inpp4b* primary antibodies detect a ~135 kDa band in *Inpp4b $\alpha$ -EGFP* transfected cells and a slightly lower ~126 kDa band in *Inpp4b $\alpha$ s-EGFP* transfected cell extracts (Fig 3-6E). This result confirmed that *Inpp4b $\alpha$ s* is produced from an alternative translation start codon. This new *Inpp4b* isoform contain all the protein domains of *Inpp4b $\alpha$*  excepted the 85 N-terminal amino acid, which are substituted by a novel sequence of 24 news amino acid and *Inpp4b $\alpha$ s* lacks half of the C2 domain (Fig 3-6B). For unexplained reasons *Inpp4b $\alpha$ s-EGFP* fusion protein have a lower expression level than *Inpp4b $\alpha$ -EGFP* protein in COS cells. This may result from a lower stability of the protein or by the used of the alternative start codon that does not correspond to a consensus Kozak sequence in *Inpp4b $\alpha$ s*. Interestingly, *Inpp4b $\alpha$*  and *Inpp4b $\alpha$ s* EGFP fusion proteins transfected in COS cells demonstrated a similar cytosolic localization as detected by EGFP fluorescence (Fig 3-6F). Together, these results demonstrated that the *Inpp4b $\alpha$ s* represent a novel isoform of the *Inpp4b* protein in addition to the differentially expressed  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms.

**Subcellular localization of Inpp4b $\alpha$  and Inpp4b $\beta$  proteins**

To determine the cellular localization of the different Inpp4b isoforms, full length cDNAs of Inpp4b $\alpha$  and Inpp4b $\beta$  were inserted in frame into an EGFP expression vector, and the chimaeric proteins were expressed in COS cells. Compared to EGFP control expressing cells, Inpp4b $\alpha$ -EGFP is distributed uniformly in the cytoplasm and excluded from the nucleus (Fig 3-7A and D). Interestingly, a more restricted and specific localization for Inpp4b $\beta$ -EGFP was reproducibly detected in the several cells analyzed (Fig 3-7G). This restricted Inpp4b $\beta$ -EGFP localization in COS cells was consistent with an association of this isoform with the Golgi and its exclusion from other cellular membranes. This was confirmed by the colocalization of Inpp4b $\beta$ -EGFP with Golgin 97, a specific marker of the Golgi apparatus (Fig 3-7J-L).

## DISCUSSION

In this paper, we described the characterization of the mouse *Inpp4b* gene and protein. The murine gene structure is highly conserved compared with human and rat homologues. Conservation of the different protein isoforms and domains is indicative of a common cellular function. The promoter region includes several transcription factor consensus sites and three major transcription initiation sites were mapped by primer extension. Using EGFP fusion protein transfection assays, we demonstrated that the *Inpp4b* protein isoforms were differentially localized, the alpha isoform widely distributed in cytosol while the beta isoform specifically localizes with the Golgi apparatus. Two recent studies have shown, in similar experiments, that *Inpp4a* $\alpha$  colocalize with endosomes where it play a role in PI(3)P production [11;12]. Our results suggest that this is not the case for *Inpp4b* $\alpha$  and *Inpp4b* $\beta$ .

The PI3 kinase signaling pathway has been involved in numerous cellular processes including cell proliferation, differentiation and survival. However, regulation of this pathway is still poorly characterized especially for the phosphatase activities needed to counterbalance production of active phosphorylated second messengers. The expression profile of murine *Inpp4b* alpha isoform established here confirmed an ubiquitous tissue expression pattern very similar to the murine isoenzyme *Inpp4a* alpha and beta isoforms. In contrast, the *Inpp4b* beta isoform showed a more restricted pattern limited to brain, heart, intestine, skeletal muscle and spleen. Specificity of this pattern is further emphasized when expression was monitored in cells from hematopoietic lineage. Only the *Inpp4b* alpha isoform displays a high level of expression in enriched hematopoietic cells populations as monocytes, T and B lymphocytes, and NK cells, compared to the *Inpp4b* beta and to *Inpp4a* alpha and beta isoforms.

The *Inpp4b* promoter sequence analysis revealed consensus binding sequences for several transcription factor, such as ETS, GKLF, SP1, c-Myb, AP-2alpha, MEF-2, NF- $\kappa$ B and GATA. Gut-enriched Kruppel-like factor 4 (GKLF/KLF4) generally act as a tumor suppressor by repressing specific gene expression and has been implicated in colon and breast cancer [21;22], but also in the repression of CD11d promoter in myeloid cell [23]. Repression by GKLF may explain why *Inpp4b* has lower level of expression in macrophages and bone marrow monocytes compared to lymphocytes (Fig 3-5B and data not shown). Recently, the c-Myb transcription factor has been implicated in hematopoiesis and more specifically in megakaryocytopoiesis [24;25]. One could think that regulation of the *Inpp4b* gene by c-Myb is responsible for its expression in lymphocyte and megakaryocytes [9]. MEF-2 proteins are members of the MADS-box family of transcription factors and are implicated in cardiac and skeletal muscle differentiation, but also in neurons and immune cells. Regulation *Inpp4b* transcription by MEF-2 may account for its strong muscle and brain expression. However, as *Inpp4b* is expressed in several tissues, its expression might be regulated by tissues-specific or nonspecific transcription factors, such as SP1.

Our analysis of the *Inpp4* family in various organisms, demonstrate that a common feature among *Inpp4* protein is the presence of one conserved C2 C-terminus domain, except in *C. elegans* 4-phosphatase where the presence of a PH domain is predicted. We have assessed the lipid binding properties of mouse *Inpp4b*-C2 domain and find that it preferentially binds to phosphatidic acid and to PI(3,4,5)P<sub>2</sub>. Given the fact that *Inpp4a*-C2 domain interact preferentially with PI(3,4)P<sub>2</sub> and PI(4)P [11], our result suggest that *Inpp4a*-C2 and *Inpp4b*-C2 have different lipid binding specificity that may explain the different subcellular localization of *Inpp4a* $\alpha$  and *Inpp4b* $\alpha$ . Consistently with this hypothesis, Ivetac *et al.* have showed that the C2 domain of *Inpp4a* $\alpha$  is required for its recruitment to endosomal membranes.

Previous studies have failed to show phosphatase activity for *Inpp4b* $\beta$  isoform in an *in vitro* assay using PI(3,4)P<sub>2</sub> as substrate [7]. It was speculated that tissue specific

cofactors or precise subcellular localization is require *in vivo* to observe the phosphatase activity of Inpp4b $\beta$ . Consistently, as the beta spliced isoform includes a putative transmembrane domain, the resulting protein is most likely exclusively associated with a membrane in a precise cellular compartment. Our localization analysis confirmed that the beta isoform is localized within the Golgi apparatus. This unique localization may implicate specific protein-protein interactions and substrates present only within this organelle, ensuring specificity for this phosphatase isoform. This result also suggests that the C-terminus of Inpp4b $\beta$  contains a specific signal that is responsible for the retention of this transmembrane isoform to the Golgi. Interestingly, the different cellular localization of Inpp4b $\alpha$  and  $\beta$  isoform is similar to what is observed with the two isoform of phosphatidylinositol 4-kinase type II (PI4KII). In this case, PI4KII $\alpha$  is located at the *transgolgi* network were it is implicated in the production of PI(4)P [26], while PI4KII $\beta$  is a cytosolic protein [27].

Additional fine tuned control of Inpp4b expression and function may rely on alternative splicing. The presence of multiple isoforms for Inpp4b may represent a way to specify tissue expression and may represent a general strategy in the 4-phosphatase family to generate from the same gene multiple proteins with different functions. For example, at least 4 different isoforms have been described for the human INPP4A protein: INPP4A $\alpha_1$ , INPP4A $\alpha_2$ , INPP4A $\alpha_3$  AND INPP4A $\beta$  [7;28].

Interestingly, we characterized a novel Inpp4b alpha alternative splicing excluding exon 5. In this a new isoform, Inpp4b $\alpha_s$ , the 85 most N-terminal amino acids present in Inpp4b $\alpha$  are substituted by 24 news amino acids, resulting in lost of half of the C2 domain. This isoform seems to be present at the RNA level in the majority of tested mouse tissues except the brain in which expression is undetectable. In COS cells, localization of Inpp4b $\alpha_s$  is similar to the native full-length form of the protein. However, truncation of the C2 domain in Inpp4b $\alpha_s$  suggests that this isoform would

have altered lipid-binding properties and consequentially, be submitted to different regulation mechanisms.

Together, our results demonstrated high structure conservation for the murine *Inpp4b* gene and proteins compared not only with other vertebrates like rat and human, but also with more primitive organisms like insects and nematodes. The establishment of a detailed expression profile of *Inpp4* isoforms defined strong tissue specificity for the *Inpp4b* alpha isoform who associated with hematopoietic lineage, suggesting most likely a unique function in these cells. Our characterization of the murine *Inpp4b* gene structure and expression specificity set the basis toward *in vivo* functional studies on the role of *Inpp4b* in normal and defective hematopoiesis.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank M. Pata for technical assistance. We are grateful to Drs S. Meloche and G. Sauvageau for supplying materials. This work was supported by Canadian Institutes of Health Research (MOP44079) and National Sciences and Engineering Council of Canada (OPG0155277) grants to J.V. M.F. is supported by a doctoral training award from the Canadian Institutes of Health Research.

**A**

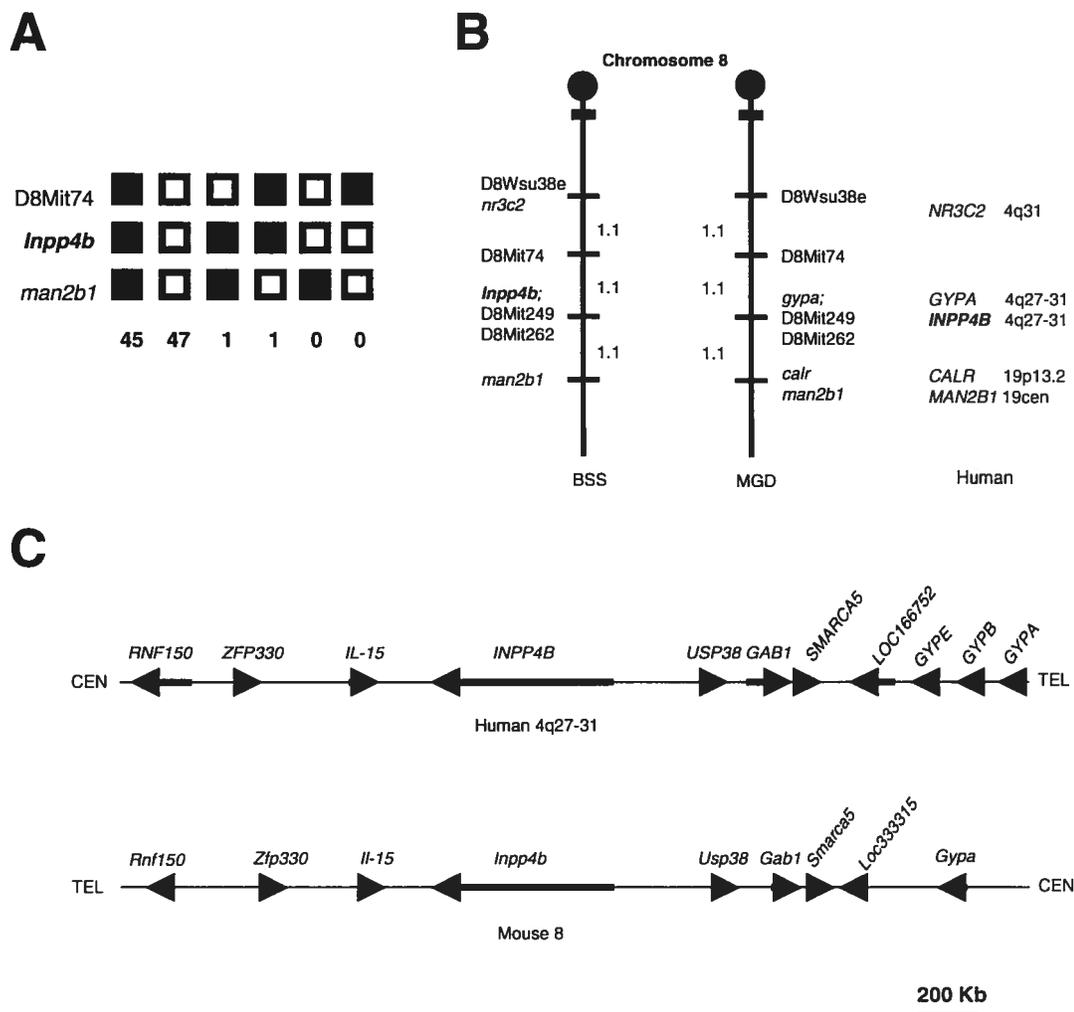
Mouse	1	MEIKEEGTSEGGHFLPAAQAHDP	<u>DI</u> OFTSIQKI PHEPOLEF ILACRDLVAPVSDRKLK	
Rat	1	MEIKEEGTSEGGHFLPAAQAHDP	<u>DI</u> OFTSIQKSPHEPOLEF ILACKDLVAPVSDRKLK	
Human	1	MEIKEEGTSEGGHFLPAAQAHDP	<u>DI</u> COFTSIQKTPHEPOLEF ILACKDLVAPVSDRKLK	
		*****	*****	
				↓ ↓
Mouse	61	<u>TVVQISVIHPVEQTLTRYSSTEI</u> VEGTDKPLFLTGVTFFPDYPIYEETRIKLTIVYDVKDK		
Rat	61	<u>TVVQISVIHPVEQTLTRYSSTEI</u> VEGTDKPLFLTGVTFFPDYPIYEETRIKLTIVYDVKDK		
Human	61	<u>TVVQISVIHPVEQSLTRYSSTEI</u> VEGTRDPLFLTGVTFFSEYPIYEEETRIKLTIVYDVKDK		
		*****	*****	
				↓
Mouse	121	<u>SHDITRTSVLPEHKDPPPEVA</u> RSFLGCASFVGGELLKSKQELLSLRLTSDGGKVVGTIE		
Rat	121	<u>PHDITRTSVLPEHKDPPPEVA</u> RSFLGCASFVGGELLKSKQELLSLRLTSDGGKVVGTIE		
Human	121	<u>SHDITRTSVLPEHKDPPPEVGH</u> RSFLGCASFVGGELLKSKQELLSLRLTSDGGKVVGTIE		
		*****	*****	
Mouse	181	VSLVKMGEIEDGDTDHI TTDVGGQKCALMYESTAPESLSGKENLPMHIAVLRHPVCKLYR		
Rat	181	VSLVKMGEIEDGDTDHI TTDVGGQKCALVYDSTAPESLSGKENLPMHIAVLRHPVCKLYR		
Human	181	VSVMKGEIEDGEADHI TTDVGGQKCALVCECTAPESVSGKDLPLFLNSVLKHPVCKLYR		
		*****	*****	
Mouse	241	PFTSDNKMMRIREQMSSEI LSPHI PKELI L <sup>1</sup> HKEDL <sup>1</sup> RHQELKELGDLSPHMDLNRKIV		
Rat	241	PFTSDNKMMRIREQMSSEI LSPHI PKELI L <sup>1</sup> HKEDL <sup>1</sup> RHQELKELGDLSPHMDLNRIRV		
Human	241	PFTSDNKMMRIREQMSSEI LSPHI PKELI L <sup>1</sup> HKEDL <sup>1</sup> RHQEI KELGELSPHMDLNRKIV		
		*****	*****	
Mouse	301	LSHCQMVTHYQDILTELSKETGSSFKSSSSGKENTLEFVPIHLQRMQVHSPHLKDAL		
Rat	301	LSHCQMVTHYQDILTELSKETGSSFKSSSSGKENTLEFVPIHLQRMQVHSPHLKDAL		
Human	301	LTHCQMVTHYQDILTELSKETGSSFKSSSSGKENTLEFVPIHLQRMQVHSPHLKDAL		
		*****	*****	
Mouse	361	YDVI TVGAPAAHFQGFKINGLRLKLLHRFETERRITGYOFIYSPENTAKAKEVLSI <sup>1</sup> HQL		
Rat	361	YDVI TVGAPAAHFQGFKINGLRLKLLHRFETERRITGYOFIYSPENTAKAKEVLSI <sup>1</sup> HQL		
Human	361	YDVI TVGAPAAHFQGFKINGLRLKLLHRFETERRITGYOFIYSPENTAKAKEVLSI <sup>1</sup> HQL		
		*****	*****	
Mouse	421	<u>QPLIATHADLLLSASORS</u> PDLSKSLKLSKTELVFAFKDQLVRSALLAYTARPGG		
Rat	421	<u>QPLVATHADLLLSASOHS</u> PDLSRSLKLSKTELVFAFKDQLVRSALLAYTARPGG		
Human	421	<u>QPLIATHADLLLSASOHS</u> PDLSKSLKLSKTELVFAFKDQLVRSALLAYTARPGG		
		*****	*****	
Mouse	481	ILKPPSPPIV <sup>1</sup> TEEKSTQNDTPQLRRD <sup>1</sup> SI PHSDYDEEEMDRVMAIVGKSLNCI <sup>1</sup> IAKV		
Rat	481	ILRPPSPKVI <sup>1</sup> TEEKSSQHDSPQLRRD <sup>1</sup> SI PHSDYDEEEMDRVMAIVGKSLNCI <sup>1</sup> IAKV		
Human	481	ILKPPSPKSTEE <sup>1</sup> SSPQDQPPVMRGD <sup>1</sup> SI PHSDYDEEEMDRVMAIVGKSLNCI <sup>1</sup> IAKV		
		*****	*****	
Mouse	540	DKLIERDSHNEGAGGSSSKDGEADHTLE <sup>1</sup> TH <sup>1</sup> HPREDNYEQLH <sup>1</sup> LI <sup>1</sup> LTLKCKMAEVVH		
Rat	541	DKLIERDSHDKSTGGSSKDGADPHLEDSLTH <sup>1</sup> HPREDNYEQLH <sup>1</sup> PL <sup>1</sup> LTLKCKMAEVVH		
Human	540	DKLIERDGGSEGGSS---HNDGEKPELSDAI <sup>1</sup> PH <sup>1</sup> HPREDNYEQLY <sup>1</sup> PL <sup>1</sup> LTLKCKMGEVNH		
		*****	*****	
Mouse	600	RAKQSLTFVLLQELAYS <sup>1</sup> LPQCLMLTLRRD <sup>1</sup> IVFQALAGLVCGF <sup>1</sup> IKLHTSLHD <sup>1</sup> PGFLQOL		
Rat	601	RAKQSLTFVLLQELAYS <sup>1</sup> LPQCLMLTLRRD <sup>1</sup> IVFQALAGLVCGF <sup>1</sup> IKLHTSLHD <sup>1</sup> PGFLQOL		
Human	597	RAKQSLTFVLLQELAYS <sup>1</sup> LPQCLMLTLRRD <sup>1</sup> IVFQALAGLVCGF <sup>1</sup> IKLQTS <sup>1</sup> LYD <sup>1</sup> PGFLQOL		
		*****	*****	
Mouse	660	HTVGLIVQVEGLLSTYSDEIGMLEDMAVGISDLR <sup>1</sup> KVAFK <sup>1</sup> ITEATSHDVL <sup>1</sup> PVLTGRREHYV		
Rat	661	HTVGLIVQVEGLLSTYSDEIGMLEDMAVGISDLR <sup>1</sup> KVAFK <sup>1</sup> ITEATSHDVL <sup>1</sup> PVLTGRREHYV		
Human	657	HTVGLIVQVEGLLSTYSDEIGMLEDMAVGISDLR <sup>1</sup> KVAFK <sup>1</sup> IEAKSHDVL <sup>1</sup> PVITGRREHYV		
		*****	*****	
Mouse	720	VEVKLPATVFESLPLOI <sup>1</sup> KEGQLLHVYPVLPVINGINEQOTLAERFGDVS <sup>1</sup> LOESINQENFEL		
Rat	721	VEVKLPATVFESLPLOI <sup>1</sup> KEGQLLHVYPVLPVINGINEQOTLAERFGDVS <sup>1</sup> LOESINQENFEL		
Human	717	VEVKLPARMFESLPLOI <sup>1</sup> KEGQLLHVYPVLPVINGINEQOTLAERFGDVS <sup>1</sup> LOESINQENFEL		
		*****	*****	
Mouse	780	VQEYYSI <sup>1</sup> FNEKMPDYI <sup>1</sup> SHFQSD <sup>1</sup> DLKGLLDH <sup>1</sup> LQHI <sup>1</sup> QAKK <sup>1</sup> KVIEI <sup>1</sup> MNLAATI <sup>1</sup> CRK <sup>1</sup> LVG		
Rat	781	VQEYYSI <sup>1</sup> FNEKMPDYI <sup>1</sup> SHFQSD <sup>1</sup> DLKGLLDH <sup>1</sup> LQHI <sup>1</sup> QAKK <sup>1</sup> KVIEI <sup>1</sup> MNLAATI <sup>1</sup> CRK <sup>1</sup> LVG		
Human	777	LQEYYSI <sup>1</sup> FNEKMPDYI <sup>1</sup> SHFQSD <sup>1</sup> DLKALLE <sup>1</sup> LQHI <sup>1</sup> QAKK <sup>1</sup> KVIEI <sup>1</sup> MNLAATI <sup>1</sup> CRK <sup>1</sup> LVG		
		*****	*****	
Mouse	840	IRFTCKSAKDR <sup>1</sup> TSM <sup>1</sup> SVTLEQCS <sup>1</sup> ILRDEH <sup>1</sup> OLHKDFFI <sup>1</sup> RALDC <sup>1</sup> MRREGCR <sup>1</sup> IENVL <sup>1</sup> KNICKR		
Rat	841	IRFTCKSAKDR <sup>1</sup> TSM <sup>1</sup> SVTLEQCS <sup>1</sup> ILRDEH <sup>1</sup> OLHKDFFI <sup>1</sup> RALDC <sup>1</sup> MRREGCR <sup>1</sup> IENVL <sup>1</sup> KNICKR		
Human	837	IRFTCKSAKDR <sup>1</sup> TSM <sup>1</sup> SVTLEQCS <sup>1</sup> ILRDEH <sup>1</sup> OLHKDFFI <sup>1</sup> RALDC <sup>1</sup> MRREGCR <sup>1</sup> IENVL <sup>1</sup> KNICKR		
		*****	*****	
Mouse	900	<u>RYAFNMLQLMAFPKCTRPPEGTGKADT</u> 928		
Rat	901	<u>RYAFNMLQLMAFPKCTRPPEGTGKADT</u> 927		
Human	897	<u>KYAFNMLQLMAFPKCTRPPEGTGKADT</u> 924		
		*****	*****	

**B**

Mouse	884	<u>SRQTGALNESDDPETGCLTDHKP</u> TSRHFYVALLVSSHLLVWVLLLSLALLAKYO	941
Rat	885	<u>SRQTGALNESDDPETGCLSDHKP</u> TSRHFYVALLVSSHLLVWVLLLSLALLAKYO	942
Human	881	<u>SRQTGALNESDDPETGCLTDHKP</u> TSRHFYVALLVSSHLLVWVLLLSLALLAKYO	944
		*****	

**Figure 3-1. Mouse Inpp4b protein sequence.**

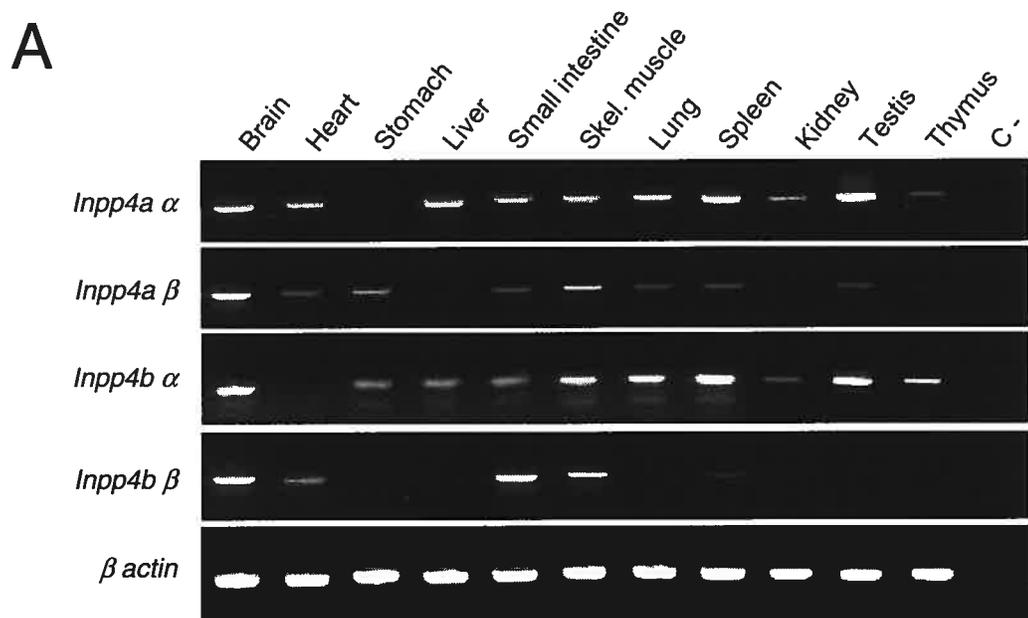
**A.** Alignment of the mouse Inpp4b $\alpha$  protein with the human and rat proteins. C2 domain is boxed and the conserved aspartic acid residues are indicated by arrows. The conserved consensus phosphatase catalytic site is underlined. The protein sequence specific to the alpha isoform which result from an alternative splicing is in bold. **B:** Alignment of the mouse Inpp4b beta isoform C-terminus with human and rat homologues. The putative transmembrane domain is underlined.



**Figure 3-2. *Inpp4b* genetic and physical maps.**

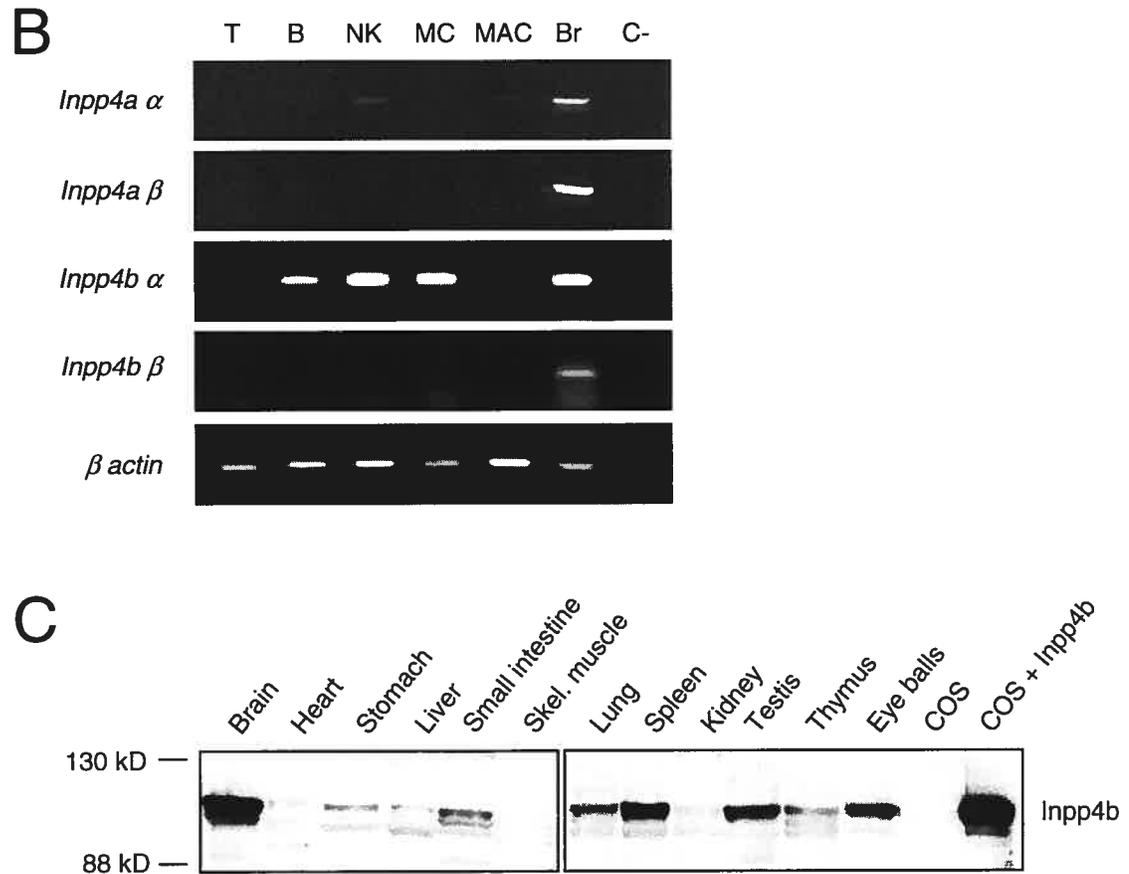
**A.** Haplotype analysis of the 94 (*Mus spretus* x C57BL/6) F1 x *Mus spretus* backcross progeny (BSS). Each column represents a chromosomal haplotype identified in the backcross and inherited from the F1 parents. The number of individuals is listed beneath each column. Open squares represent the C57BL/6 allele, and filled squares represent the *Mus spretus* allele as determined by PCR-VNTR for *Inpp4b* and RFLP and SSLP for other markers indicated at the left. **B.** Genetic localization of *Inpp4b* on mouse chromosome 8 on the BSS genetic map. The MGD integrated genetic map is also shown. Corresponding syntenic regions of human chromosomes are represented at the right. **C.** Physical maps including *Inpp4b* on mouse chromosome 8 and *INPP4B* on human chromosome 4q27-31. Surrounding genes with transcripts orientation are represented.





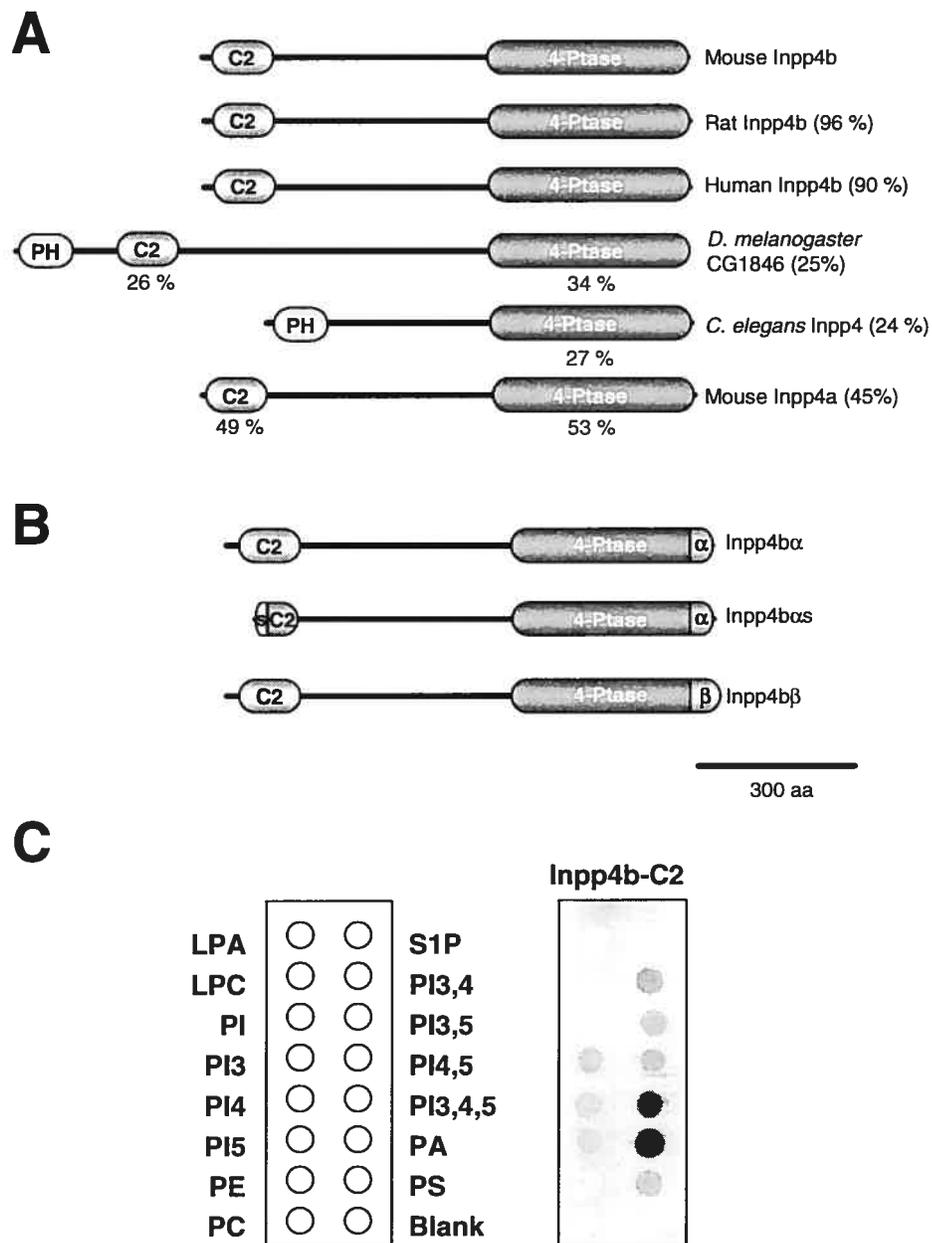
**Figure 3-4. mRNA and protein expression patterns of the different Inpp4 isoforms in mouse tissues.**

**A.** Adult expression of the different Inpp4 isoforms in mouse tissues was determined by RT-PCR.



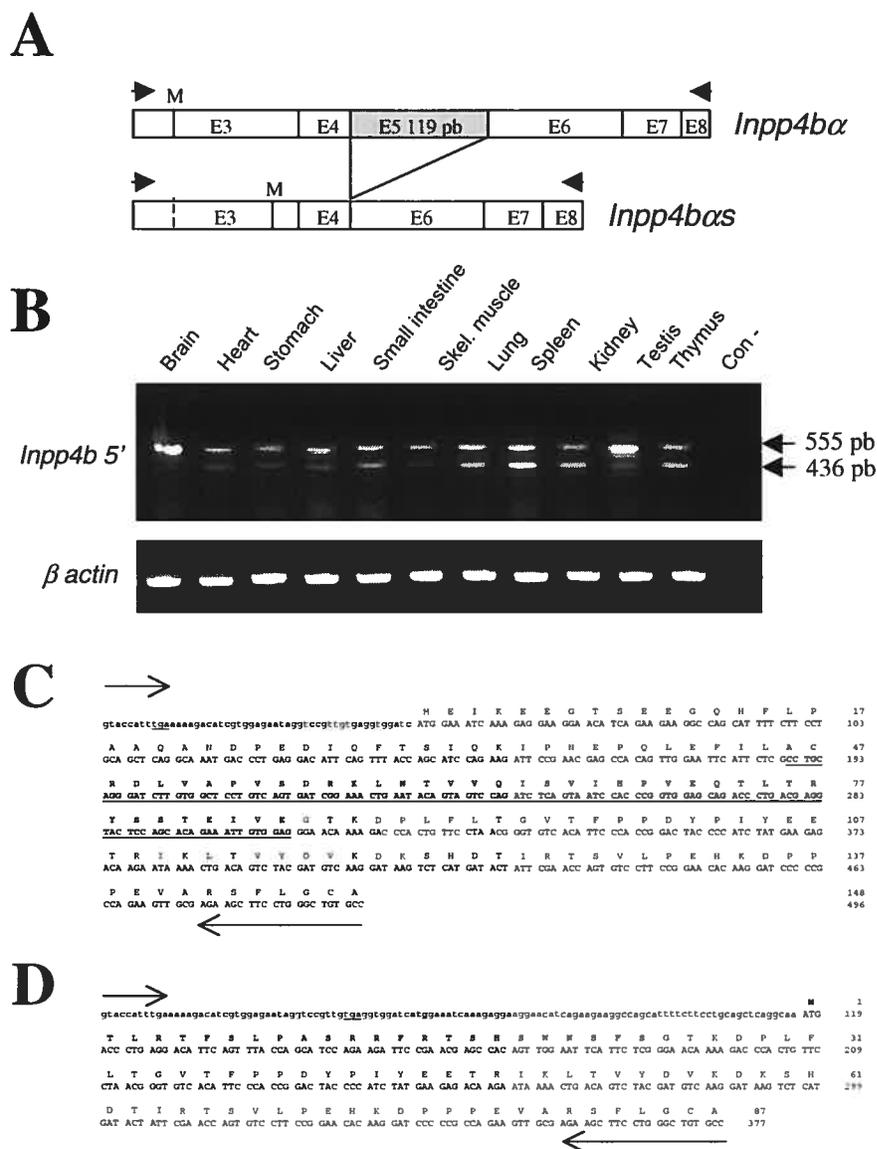
**Figure 3-4. (Continued)**

**B.** Expression of Inpp4 isoforms in enriched mouse hematopoietic cells (T: T lymphocyte, B: B lymphocyte, NK: natural killer lymphocyte, MC : mast cell, MAC : peritoneal macrophage). **C.** Inpp4b protein expression in mouse tissues was determined by Western blot using a specific Inpp4b antibody raised against the N-terminus region of the protein (aa 2-235). As control COS cells were transfected or not with the Inpp4b $\alpha$  cDNA.



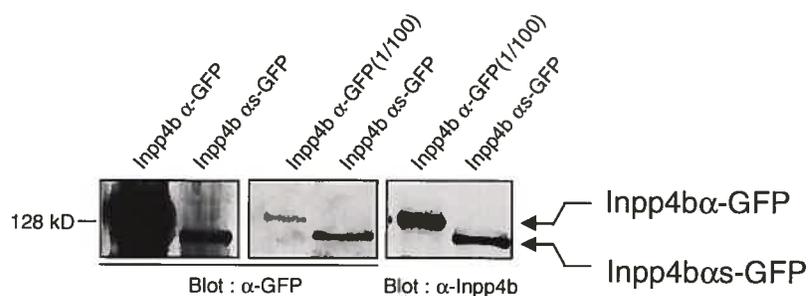
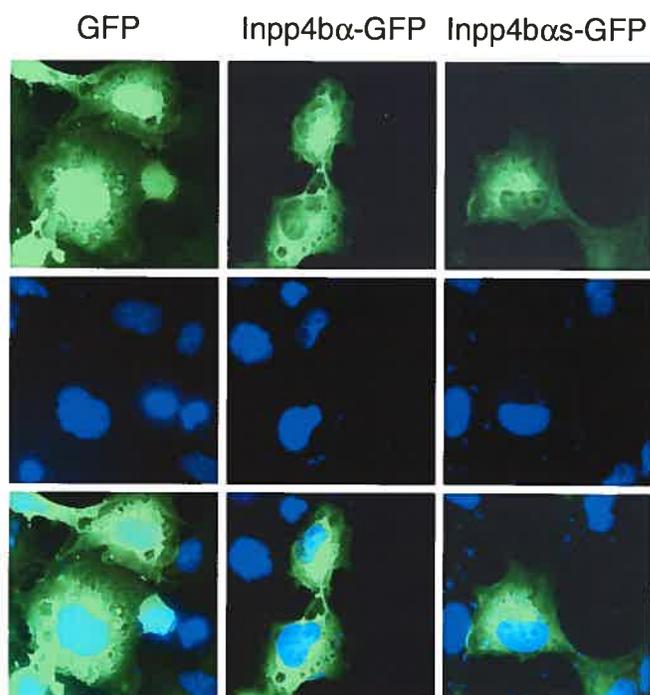
**Figure 3-5. Inpp4b orthologues and paralogues.**

**A.** Schematic representation of the Inpp4b mouse, rat, human, drosophila and nematode orthologues. Inpp4a mouse paralogue are also shown. Overall amino acid identity with mouse Inpp4b protein is indicated as percentage. Amino acid identity for the 4-Ptase active site and the C2 domains are indicated below each domain. **B.** Schematic representation of the three mouse Inpp4b isoforms characterized in this study. **C.** Phospholipid binding specificity of the Inpp4b C2 domain. Detection was achieved by hybridation with the anti-Inpp4b antibody that recognize this part of the protein (see method).

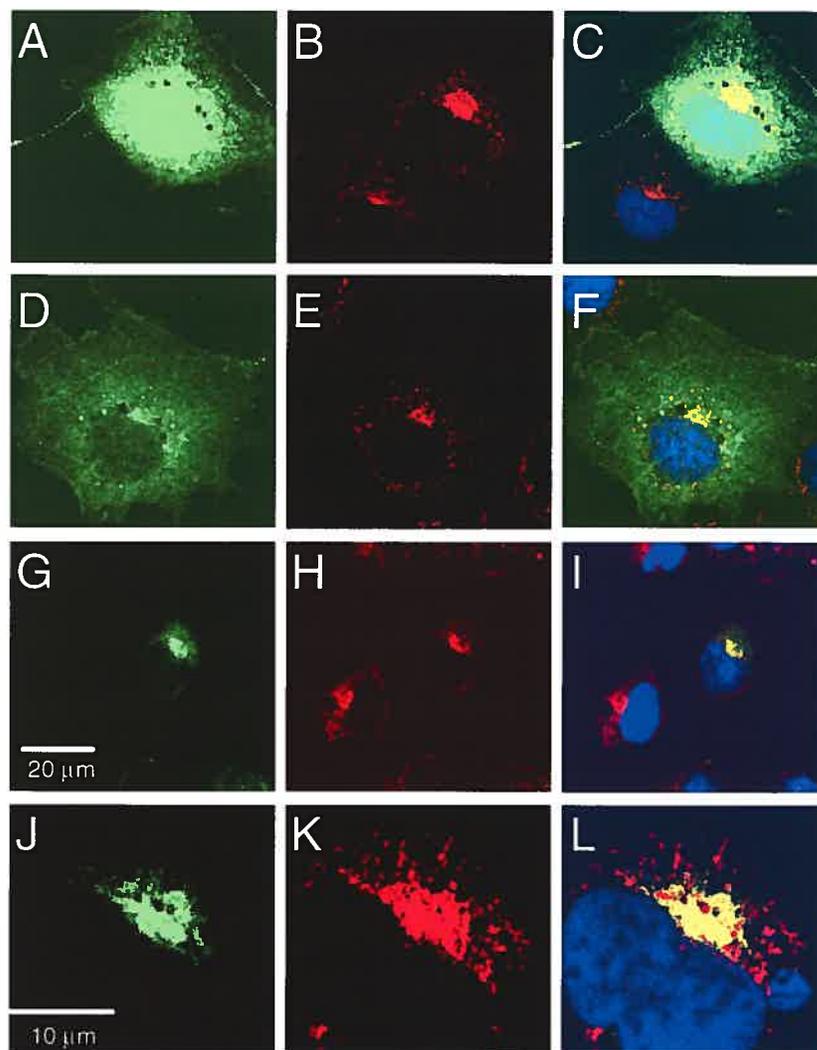


**Figure 3-6. Identification and characterization of Inpp4b $\alpha$ s, a new isoform of Inpp4b.**

**A.** Schematic representations of Inpp4b $\alpha$  and Inpp4b $\beta$ s 5' mRNAs regions. Position of the deduced start codon (M) is indicated. Arrows indicate the position of the primers used in RT-PCR. **B.** Tissue expression pattern of Inpp4b $\alpha$ s was determined by RT-PCR. The specific shorter 436 pb corresponds to Inpp4b $\alpha$ s. **C and D.** cDNA and protein sequences of Inpp4b $\alpha$  and Inpp4b $\beta$ s respectively. The sequence corresponding to exon 5, absent in Inpp4b $\beta$ s, is underlined and bolded. The alternative N-terminus sequence of Inpp4b $\alpha$ s, absent in Inpp4b $\beta$ , is bolded in D. Up-stream in frame stop codons are underlined in both sequences. The start codon of Inpp4b $\alpha$  is bolded in the Inpp4b $\beta$ s sequence. Arrows represent primers used in RT-PCR.

**E****F****Figure 3-6. (Continued)**

**E.** The Inpp4b $\alpha$ s mRNA contains a functional open reading frame. cDNAs corresponding to Inpp4b $\alpha$  and Inpp4b $\alpha$ s were cloned in N-terminal of GFP in an expression vector and transfected in COS cells. Expression of the resulting fusion proteins was assessed by Western blotting using antibodies against Inpp4b or GFP. In the left panel, equal amount of protein extract were loaded (25  $\mu$ g). In the middle and the right panel, only 0.25  $\mu$ g of Inpp4b $\alpha$ -GFP extract was loaded (1/100). **F.** Subcellular localization of Inpp4b $\alpha$ -GFP and of Inpp4b $\alpha$ s-GFP in COS cells (upper panels). Nuclei were stained with Hoesch (middle panels). Merge pictures demonstrate a cytoplasmic distribution of both isoforms (bottom panels).



**Figure 3-7. Subcellular localization of Inpp4b $\alpha$ -GFP and Inpp4b $\beta$ -GFP isoforms in COS cells.**

In COS cells transfected with either GFP (A-C), Inpp4b $\alpha$ -GFP (D-F) or Inpp4b $\beta$ -GFP (G-L), localization of the different GFP fusion proteins was detected using confocal microscopy (A,D,G,J). Cells were counterstained with anti-Golgin 97 antibody (red : B,E,H,K). Nuclei (blue) were stained using TO-PRO-3 dye. Merge pictures demonstrated colocalization of Inpp4b $\beta$  with Golgin (C,F,I,L).

**Table 3-1. Exon-intron boundaries of the Mouse Inositol Polyphosphate 4-Phosphatase Type II Gene.**

Exon no.	Exon boundary <sup>b</sup>		Exon length	Intron no.	Intron boundary		Intron length
	5'	3'			5'	3'	
1 <sup>a</sup>	tgtgcg	caagag	91	1	gtaacatcc	tgccccacag	129959
2 <sup>a</sup>	aaccaca	cccaag	63	2	gtggtaaaa	atttcacag	>280000
3	tggaact	ACC A	194	3	gtaagtgtg	tatttatag	2569
4	GC ATC	CTC G	45	4	gtaaggaat	tgttgccag	>24000
5 <sup>b</sup>	CC TGC	GTG GAG	119	5	gtgagcctg	tgttttcag	2595
6	GGA ACA	GAT ACT	117	6	gtaagtact	tctccatag	>74000
7	ATT CGA	GTT GCG	51	7	gtaggtgct	tattttcag	>12000
8	AGA AGC	CTG AG	80	8	gtgagtctc	tacttgacag	27361
9	A ACC	CAA AAG	112	9	gtaggactg	atgttccag	6466
10	TGT GCA	GCA G	73	10	gtaatgtaac	cttgcccag	11942
11	TC TTA	TGT AG	148	11	gtaagagaa	tcttaacag	49305
12	A AAC	ACA G	131	12	gtatgaagc	ttcttctag	378
13	GG TCC	AAA G	105	13	gtattgata	cccttccag	>13000
14	AT GCT	AGG AA	109	14	gtaagtaat	tctttgcag	15617
15	C ACC	GAA AAA	178	15	gtaagatcc	tctttgcag	11785
16	ACT GAG	GAG TGG	204	16	gtaagtctc	tgctttcag	13135
17	GAT AGG	CGT G	166	17	gtaagaact	ctgcccacag	>22000
18	AG GAC	CAG GCG	173	18	gtgggtgcc	ttttctcag	1151
19	CTT GCT	TAC A	124	19	gtaagtatt	cctgtgcag	7386
20	GT GAT	AGA CG	118	20	gtgagtggg	tgcttgcag	4215
21	G GAA	GAG AG	141	21	gtaggctga	tatttttag	2096
22	G TTT	GAT T	98	22	gtaagtata	atcctgtag	>20000
23	AT ATT	GCA ACG	113	23	gtaagcact	gtcttgcag	2636
24	ATT TGT	AGA AG	155	24a	gtatcgtac	taacagcag	>50000
25a <sup>b</sup>	A AAA	CAA TAA	~1340	24b	gtatcgtac	tttccccag	>50000
25b <sup>b</sup>	A GAA	ACC TAA	~190				

<sup>a</sup> These two exons contain 5' untranslated sequence. The ATG (start codon) is in exon 3.

<sup>b</sup> Alternatively spliced exons.

**Table 3-2. Exon-intron boundaries of the Human Inositol Polyphosphate 4-Phosphatase Type II Gene.**

Exon no.	Exon boundary		Exon length	Intron no.	Intron boundary		Intron length
	5'	3'			5'	3'	
1 <sup>a</sup>		ggagag	?	1	gtaattacc	ttcccgtag	120307
2 <sup>a</sup>	aataca	acaaag	63	2	gtaatgctt	gtttcctag	294453
3	gtacag	ACA A	217	3	gtaagtatg	tatttatag	1951
4	GT ATC	CTT G	45	4	gtaagaaat	cgttgccag	23848
5	CA TGC	GTG GAG	119	5	gtgagatgc	ctgttacag	2151
6	GGA ACA	GAC ACC	117	6	gtaagtact	tctccacag	88175
7	GTT CGA	GTT GGG	51	7	gtaagtgtt	tattttcag	9174
8	CGA AGT	CTG AG	80	8	gtgggtctc	ttggtgcag	34683
9	A ACT	CAA AAG	112	9	gtaggatct	ttttcctag	10098
10	TGT GCC	TCA G	73	10	gtatgtaac	tttttccag	22480
11	TG TTA	TGC AG	148	11	gtaagagaa	tcttaacag	28837
12	A AAC	ACA G	131	12	gtgtggaag	ttccatcag	366
13	GG TCC	AAA G	105	13	gtatcataa	ctactccag	15229
14	AT GCT	AGA AA	109	14	gtaagtaaa	ttggtgcag	19277
15	T ACC	GAA AAA	178	15	gtaagatcc	tctttccag	13070
16	ACA GAG	GAG TGG	204	16	gtaagtctc	ttttttcag	14361
17	GAC AGG	AGA G	157	17	gtaagaaat	ttccccag	21079
18	AG GAC	CAA GCA	173	18	gtaggtgcc	ttttttcag	1172
19	CTT GCT	TAC A	124	19	gtgagtatt	attgtttag	1046
20	GC GAT	AGA CG	118	20	gtaagcagt	cttctttag	9445
21	A GAA	GAA AG	141	21	gtaagcttt	tgtttgtag	4351
22	G TTT	GAT T	98	22	gtaagtatg	ccccctcag	21836
23	AT ATT	GCA AGC	113	23	gtaagcact	atgttacag	3958
24	ATT TGC	AGA AG	155	24a	gtatctcac	atttaacag	51728
25a <sup>b</sup>	C AGA	CAA TAA	~1340	24b	gtatctcac	tttcaccag	53116
25b <sup>b</sup>	A GAA	AGC TGA	~165				

<sup>a</sup> These two exons contain 5' untranslated sequence. The ATG (start codon) is in exon 3.

<sup>b</sup> Alternatively spliced exons.

**REFERENCES**

- 1 Cantley, L. C. (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**, 1655-1657
- 2 De Matteis, M. A. and Godi, A. (2004) PI-loting membrane traffic. *Nat.Cell Biol.* **6**, 487-492
- 3 Majerus, P. W., Kisseleva, M. V., and Norris, F. A. (1999) The role of phosphatases in inositol signaling reactions. *J.Biol.Chem.* **274**, 10669-10672
- 4 Leslie, N. R. and Downes, C. P. (2002) PTEN: The down side of PI 3-kinase signalling. *Cell Signal.* **14**, 285-295
- 5 Ware, M. D., Rosten, P., Damen, J. E., Liu, L., Humphries, R. K., and Krystal, G. (1996) Cloning and characterization of human SHIP, the 145-kD inositol 5-phosphatase that associates with SHC after cytokine stimulation. *Blood* **88**, 2833-2840
- 6 Norris, F. A., Auethavekiat, V., and Majerus, P. W. (1995) The isolation and characterization of cDNA encoding human and rat brain inositol polyphosphate 4-phosphatase. *J.Biol.Chem.* **270**, 16128-16133
- 7 Norris, F. A., Atkins, R. C., and Majerus, P. W. (1997) The cDNA cloning and characterization of inositol polyphosphate 4- phosphatase type II. Evidence for conserved alternative splicing in the 4-phosphatase family. *J.Biol.Chem.* **272**, 23859-23864
- 8 Munday, A. D., Norris, F. A., Caldwell, K. K., Brown, S., Majerus, P. W., and Mitchell, C. A. (1999) The inositol polyphosphate 4-phosphatase forms a complex with phosphatidylinositol 3-kinase in human platelet cytosol. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 3640-3645
- 9 Vyas, P., Norris, F. A., Joseph, R., Majerus, P. W., and Orkin, S. H. (2000) Inositol polyphosphate 4-phosphatase type I regulates cell growth downstream of transcription factor GATA-1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 13696-13701
- 10 Nystuen, A., Legare, M. E., Shultz, L. D., and Frankel, W. N. (2001) A null mutation in inositol polyphosphate 4-phosphatase type I causes selective neuronal loss in weeble mutant mice. *Neuron* **32**, 203-212

- 11 Ivetac, I., Munday, A. D., Kisseleva, M. V., Zhang, X. M., Luff, S., Tiganis, T., Whisstock, J. C., Rowe, T., Majerus, P. W., and Mitchell, C. A. (2005) The type Ialpha inositol polyphosphate 4-phosphatase generates and terminates phosphoinositide 3-kinase signals on endosomes and the plasma membrane. *Mol.Biol.Cell* **16**, 2218-2233
- 12 Shin, H. W., Hayashi, M., Christoforidis, S., Lacas-Gervais, S., Hoepfner, S., Wenk, M. R., Modregger, J., Uttenweiler-Joseph, S., Wilm, M., Nystuen, A., Frankel, W. N., Solimena, M., De Camilli, P., and Zerial, M. (2005) An enzymatic cascade of Rab5 effectors regulates phosphoinositide turnover in the endocytic pathway. *J.Cell Biol.* **170**, 607-618
- 13 Takumi, T. and Lodish, H. F. (1994) Rapid cDNA cloning by PCR screening. *Biotechniques* **17**, 443-444
- 14 Rowe, L. B., Nadeau, J. H., Turner, R., Frankel, W. N., Letts, V. A., Eppig, J. T., Ko, M. S., Thurston, S. J., and Birkenmeier, E. H. (1994) Maps from two interspecific backcross DNA panels available as a community genetic mapping resource. *Mamm.Genome* **5**, 253-274
- 15 Benachenhou, N., Massy, I., and Vacher, J. (2002) Characterization and expression analyses of the mouse Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) family member Wave1/Scar. *Gene* **290**, 131-140
- 16 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
- 17 Coulombe, P. and Meloche, S. (2002) Dual-tag prokaryotic vectors for enhanced expression of full-length recombinant proteins. *Anal.Biochem.* **310**, 219-222
- 18 Overduin, M., Cheever, M. L., and Kutateladze, T. G. (2001) Signaling with phosphoinositides: better than binary. *Mol.Interv.* **1**, 150-159
- 19 Mehrotra, B., Myszka, D. G., and Prestwich, G. D. (2000) Binding kinetics and ligand specificity for the interactions of the C2B domain of synaptogmin II with inositol polyphosphates and phosphoinositides. *Biochemistry* **39**, 9679-9686
- 20 Chung, S. H., Song, W. J., Kim, K., Bednarski, J. J., Chen, J., Prestwich, G. D., and Holz, R. W. (1998) The C2 domains of Rabphilin3A specifically bind phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate containing vesicles in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner. In vitro characteristics and possible significance. *J.Biol.Chem.* **273**, 10240-10248

- 21 Zhao, W., Hisamuddin, I. M., Nandan, M. O., Babbin, B. A., Lamb, N. E., and Yang, V. W. (2004) Identification of Kruppel-like factor 4 as a potential tumor suppressor gene in colorectal cancer. *Oncogene* **23**, 395-402
- 22 Ai, W., Liu, Y., Langlois, M., and Wang, T. C. (2004) Kruppel-like factor 4 (KLF4) represses histidine decarboxylase gene expression through an upstream Sp1 site and downstream gastrin responsive elements. *J.Biol.Chem.* **279**, 8684-8693
- 23 Noti, J. D., Johnson, A. K., and Dillon, J. D. (2005) The leukocyte integrin gene CD11d is repressed by gut-enriched Kruppel-like factor 4 in myeloid cells. *J.Biol.Chem.* **280**, 3449-3457
- 24 Sandberg, M. L., Sutton, S. E., Pletcher, M. T., Wiltshire, T., Tarantino, L. M., Hogenesch, J. B., and Cooke, M. P. (2005) c-Myb and p300 Regulate Hematopoietic Stem Cell Proliferation and Differentiation. *Dev.Cell* **8**, 153-166
- 25 Metcalf, D., Carpinelli, M. R., Hyland, C., Mifsud, S., Dirago, L., Nicola, N. A., Hilton, D. J., and Alexander, W. S. (2005) Anomalous megakaryocytopoiesis in mice with mutations in the c-Myb gene. *Blood* **105**, 3480-3487
- 26 Wang, Y. J., Wang, J., Sun, H. Q., Martinez, M., Sun, Y. X., Macia, E., Kirchhausen, T., Albanesi, J. P., Roth, M. G., and Yin, H. L. (2003) Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi. *Cell* **114**, 299-310
- 27 Wei, Y. J., Sun, H. Q., Yamamoto, M., Wlodarski, P., Kunii, K., Martinez, M., Barylko, B., Albanesi, J. P., and Yin, H. L. (2002) Type II phosphatidylinositol 4-kinase beta is a cytosolic and peripheral membrane protein that is recruited to the plasma membrane and activated by Rac-GTP. *J.Biol.Chem.* **277**, 46586-46593
- 28 Shearn, C. T., Walker, J., and Norris, F. A. (2001) Identification of a novel spliceoform of inositol polyphosphate 4- phosphatase type Ialpha expressed in human platelets: structure of human inositol polyphosphate 4-phosphatase type I gene. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **286**, 119-125

**CHAPITRE 4. EXPRESSION SPÉCIFIQUE DE LA RECOMBINASE CRE  
DANS LES MACROPHAGES ET LES OSTEOCLASTES DANS LES SOURIS  
TRANSGÉNIQUES CD11B-CRE**

#### 4.1. MISE EN SITUATION

Les études présentées au chapitre 2 suggèrent un rôle pour *Inpp4b* dans la différenciation et la fonction des ostéoclastes. Afin de confirmer l'importance d'*Inpp4b* dans l'homéostasie osseuse *in vivo*, nous avons décidé de déléter le gène *Inpp4b* chez la souris. Les études d'expression que nous avons réalisées montrent qu'*Inpp4b* est exprimée dans la plupart des tissus (voir chapitre 3). L'ablation totale du gène *Inpp4b* pourrait donc causer des défauts lors du développement de ces tissus et même provoquer la mort *in utero* des embryons. Afin d'éviter ce problème, mais également dans le but de pouvoir étudier précisément le rôle d'*Inpp4b* dans les ostéoclastes, nous avons choisi d'utiliser le système Cre/lox qui permet l'ablation conditionnelle d'un gène dans un tissu précis. Le système Cre/lox nécessite deux outils génétiques, un allèle « floxé » du gène que l'on veut cibler (voir chapitre 5) et une souris transgénique qui exprime la Cre recombinase dans le tissu d'intérêt. Dans notre cas, nous souhaitons développer une souris qui exprimerait la Cre dans les ostéoclastes, mais également dans leurs précurseurs, un outil génétique qui n'était pas disponible à ce moment. Dans ce troisième article, il est décrit comment nous avons généré une souris CD11b-Cre qui permet l'expression fonctionnelle de la Cre dans les monocytes, les macrophages et les ostéoclastes.

## 4.2. ARTICLE 3

### TARGETED EXPRESSION OF CRE RECOMBINASE IN MACROPHAGES AND OSTEOCLASTS IN TRANSGENIC MICE

MATHIEU FERRON and JEAN VACHER<sup>#</sup>

Institut de recherches cliniques de Montréal, Faculté de Médecine de l'Université de Montréal.

<sup>#</sup> : Corresponding author

[REDACTED]

[REDACTED]

Article publié dans Genesis, Mars 2005, 41, pp.138-45.

Contribution des auteurs :

Mathieu Ferron : Ensemble de l'étude, participation à la rédaction du manuscrit sous la supervision du Dr Jean Vacher.

Jean Vacher : Supervision scientifique, gestion des croisements de souris et rédaction du manuscrit.

## SUMMARY

To develop specific conditional gene ablation in the hematopoietic myeloid-osteoclast lineage, transgenic mice expressing Cre recombinase under the control of the CD11b promoter were generated on the C57BL/6 background. The cellular specificity of Cre activity following recombination was quantified in the Z/EG reporter transgenic mice by FACS analysis with lineage specific markers and EGFP co-expression. A high degree of recombination, as evidenced by EGFP positive cells, was demonstrated in macrophages and granulocytes of bone marrow and spleen by the presence of double positive cells CD11b/EGFP and Gr1/EGFP respectively. Interestingly, the peritoneal macrophage population showed almost complete DNA recombination at large. Most importantly, mature osteoclast cells derived from the double transgenic bone marrow and spleen progenitors were EGFP positive. Hence, these CD11b-Cre mice will provide a unique tool to unravel novel gene function and activities involved during osteoclast and macrophage differentiation and maturation processes.

## RESULTS AND DISCUSSION

The advent of homologous recombination and murine embryonic cell lines has allowed functional studies *in vivo* by manipulation and removal of specific gene activity in the mouse genome. However, early embryonic lethality in systemic knockout approach has serious limitations by preventing identification of important roles for genes in later stages of development. The Cre-Lox system (Sauer, Henderson, 1988; Nagy, 2000) introduced the notion of the conditional knock-out approach, based on a tissue- and time-specific gene inactivation in mouse, and this approach has been particularly useful to unravel the role of specific genes in the hematopoietic lineage. A series of transgenic mice expressing the Cre recombinase under the control of a promoter targeting the entire hematopoietic system or a specific cell lineage has been generated, including the *vav*-Cre (de Boer et al., 2003) or more specifically, the CD19-Cre and *lck*-Cre mice (Rickert et al., 1997; Hennet et al., 1995).

To study the role of genes upon macrophage/osteoclast lineage differentiation, it is essential to develop a system that can target Cre to this hematopoietic lineage. Toward this aim we have selected the human CD11b regulatory elements that have previously been used to target transgene expression in this lineage.

CD11b encodes the  $\alpha$  subunit of the Mac-1 leukocyte integrin heterodimer, a major adhesion molecule and a commonly used hematopoietic surface marker. This gene is upregulated during myeloid differentiation with the highest levels in mature monocytes, macrophages and neutrophils (Beller et al., 1982; Rosmarin et al., 1989). Importantly, the CD11b is also expressed along the osteoclast differentiation pathway from mononucleated early progenitor cells until mature polynucleated osteoclasts (Fujikawa et al., 1996; Shalhoub et al., 2000). The hematopoietic specificity of the human CD11b promoter has been demonstrated since it is active only in

hematopoietic cells *in vitro* by transfection assays (Pahl et al., 1992) and *in vivo* in transgenic mice (Dziennis et al., 1995). The upstream regulatory region of the human CD11b gene (1.7kb) linked to Thy 1.1 or the *lacZ* gene was shown in two transgenic lines to be sufficient to direct high level expression in monocytes, macrophages and neutrophils (Dziennis et al., 1995). Furthermore, the CD11b transgene expression was also detected in sub-populations of T and B cells, but excluded from other hematopoietic and non-hematopoietic cells and tissues (Back et al., 1995).

In this study, we have generated and characterized transgenic mouse lines expressing the Cre recombinase under the control of the CD11b promotor. The CD11b-Cre transgene construct as shown in Figure 4-1a, served to produce the CD11b-Cre transgenic mice. These mice are readily available for mating analysis since we engineered these transgenic mice on the pure inbred C57BL/6 background. Three transgenic founder mice (A, B, C) were produced out of 37 live mice. Two transgenic founder mice had intact transgene (A, B) and lines were established, whereas the third founder C had apparently integrated a truncated form of the transgene (data not shown) and consistently no expression was detected in this line. In the two intact transgenic lines, expression of the transgene was demonstrated in peritoneal macrophages using RT-PCR assays (Fig 4-1b). The ~1.8 kb RT-PCR amplicon corresponds to a fully spliced mRNA as confirmed by sequencing, while the partially spliced ~2 kb fragment results from the retention of the hGH intron 1 in the Cre-hGH fusion mRNA. Mice from the two CD11b-Cre transgenic lines did not show any adverse phenotype, they were fertile and showed proper transgene transmission. Notably, in the transgenic mouse line A, transgene integration was in the Y chromosome as all male progenies were transgenic. Interestingly, the level of expression did not appear proportional to transgene copy number. The transgenic line B with ~40 copies of the transgene displayed low expression levels, while the line A with ~4 copies of the transgene integrated on the Y chromosome demonstrated significantly higher expression levels. These results showed that the transgene expression under the control of the CD11b promotor was strongly dependent on

chromosomal position effect and suggested the existence of additional unidentified regulatory sequences responsible for appropriate CD11b gene transcriptional activation.

To investigate the transgenic CD11b-Cre mice specificity, these mice were crossed with the double reporter mouse strain Z/EG (Novak et al., 2000). The Z/EG transgene (*lacZ-EGFP*) contained a floxed *lacZ* gene and an EGFP gene, under the control of the ubiquitous promoter chicken  $\beta$ -actin/CMV enhancer. Crossing the Z/EG mouse line with a Cre-expressing transgenic mouse line results in Cre mediated deletion of the *lacZ* gene and activation of the EGFP gene. According to the promoter specificity targeting Cre expression, this approach has the potential to identify and isolate by FACS analysis *in vivo* recombined EGFP expressing cells for further characterization. A comparative analysis was carried out on hematopoietic cells isolated from the two CD11b-Cre/Z/EG double transgenic mice (A and B) and from control single transgenic Z/EG. Both transgenic lines displayed CD11b and EGFP double positive cells in peritoneal macrophages, the transgenic line A having the highest percentage of EGFP positive cells in this population (~38%), compared to the line B (~5.5%) (Fig 4-2). Quantification of these double positive cells was also determined in the other hematopoietic cell compartments. In bone marrow, the transgenic line A showed a lower recombination efficiency demonstrated by the presence of ~25% of CD11b/EGFP double positive compared to ~40% of CD11b single positive. Since it is known that granulocytes are double positive Gr1/CD11b, we have also evaluated the level of Cre recombination in this population. Approximately 16% of the bone marrow granulocyte Gr1<sup>+</sup> population was EGFP positive cells (Fig 4-2). Essentially, all EGFP positive cells in bone marrow (~35%) consisted of the granulocyte and macrophage cell population. By contrast, the other double transgenic CD11b-Cre line B displayed a significant lower level of Cre activity in peritoneal macrophages, bone marrow, spleen and thymus (Fig 4-2, 4-3 and data not shown).

We have also analyzed recombination in additional hematopoietic tissues using the transgenic line A. Consistent with the cellular CD11b promoter specificity (Back et al., 1995), expression of EGFP following recombination was detected in approximately half of the B220<sup>+</sup> cells sub-populations in the spleen but at low levels when considering the population of mature B-lymphocytes. Low levels of recombination were also detected in splenic macrophages (Fig 4-3). In the thymus, one third of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes were EGFP positive, confirming that CD11b promoter is active in this sub-population of T cells (Back et al., 1995).

Specificity and frequency of recombination were further quantified using genomic DNA extracted from the same cell samples used in FACS analysis and from various tissues of double CD11b-Cre/Z/EG transgenic mice from line A by Southern analysis. Specific recombination of the Z/EG locus was confirmed in hematopoietic organs including bone marrow, spleen and thymus while a very low level of recombination was barely detectable in testis, liver, kidney, brain, heart and lung, possibly consistent with peripheral blood contamination (Fig 4-4). Importantly, close to 100% recombination was quantified in the peritoneal macrophage population demonstrating for transgenic line A, a very high specificity and efficiency of recombination. Although these results correlated with the FACS analysis to show that the peritoneal macrophage population exhibited the highest recombination levels, the evaluation based on EGFP expression appeared to be underestimated, possibly due to technical limitations and cell manipulations. Taken together these results demonstrated that macrophages were the main targeted cell population for Cre recombination controlled by the mouse CD11b promoter.

Analysis of Cre-mediated recombination was also investigated in microglial cells since they derived from a common precursor as macrophages (Hess et al., 2004; Priller et al., 2001). In brain of CD11b-Cre/Z/EG double transgenic mice EGFP expression was observed in several microglia-like cells (Fig 4-5a-b), as determined by their rod, amoeboid and bipolar elongated shape and by their small ovoidal nucleus

(Fig 4-5c-e). This provide evidence of specific recombination in microglial cells. In contrast, no EGFP expression was detected in neurons-like cells from CD11b-Cre/Z/EG double transgenic mice.

Because macrophages share a common hematopoietic precursor with the osteoclasts (Boyle et al., 2003), the cell responsible for bone matrix resorption, the osteoclast lineage was investigated *ex-vivo*. From the CD11b-Cre/Z/EG double transgenic line A and Z/EG controls, hematopoietic progenitors were isolated to determine whether recombination occurs in the osteoclast lineage. Hematopoietic cells including osteoclast progenitors present in bone marrow and/or spleen cells were co-cultured with primary osteoblast cells (Rajapurohitam et al., 2001) and differentiation was apparent by production of multinucleated osteoclast cells (OCLs) after 6-8 days. Importantly, when derived from CD11b-Cre/Z/EG double transgenic hematopoietic cells, all mature osteoclasts expressed EGFP at very high levels as detected by fluorescent microscopy (Fig 4-6, left panels). These multinucleated cells were bona fide OCLs as confirmed by positive tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining, a specific osteoclast marker (Fig 4-6, right panels). Since no differences were noted in osteoclast differentiation between line A and controls, the expression of EGFP or of Cre did not interfere with this process. The specificity of CD11b-Cre recombination in the macrophage/osteoclast in transgenic mouse line A provides evidence that Cre was active along this lineage differentiation pathway.

Recently, two different transgenic mice were produced expressing the Cre recombinase exclusively in mature osteoclasts (Chiu et al., 2004), by using the TRAP and the cathepsin K (Ctsk) osteoclast specific promoters. Since these transgenic lines will not address the role of specific genes in early osteoclast precursors or macrophages, this CD11b-Cre transgenic line is the first fully characterized and will be essential for targeting Cre mediated deletion of conditional alleles in early precursors to unravel gene function during osteoclast differentiation.

In summary, the generation of CD11b-Cre transgenic mice will provide a unique opportunity to study *in vitro* as well as *in vivo* the role of specific genes in osteoclasts differentiation/maturation as well as in macrophages and, by crossing them with Z/EG mice, to potentially isolate an enriched osteoclast progenitor population by cell sorting.

## MATERIALS AND METHODS

### Transgenic mice

The coding sequence of the Cre gene (1377bp) was amplified by PCR from the pIC-Cre vector (Gu et al., 1994) using primers described in Table 1. The Cre PCR product was digested with BglII and cloned in the BamHI site of the D1790 vector (Dziennis et al., 1995), downstream of the 1.7 kb specific CD11b promoter which included transcription start site and 83 bp of 5'UTR. The introns and polyA sequences from the human hGH (2154bp) have been included for efficient transgene expression. Linearized NotI/HindIII 5235pb transgene fragment was injected (1ng/ $\mu$ l) into fertilized mouse oocytes isolated from C57BL/6 crosses and transferred to pseudopregnant females. Founders were identified by PCR of tail genomic DNA (see Table1) and were subsequently crossed with Z/EG mice (Novak et al., 2000) to generate CD11b-Cre/Z/EG double transgenic mice. Transgene integrity and copy numbers were evaluated by Southern analysis using BglII or BamHI digestion and hybridization with a labeled Cre cDNA probe. To genotype Z/EG transgenic mice, tail biopsy or ear punch were fixed in 4% paraformaldehyde for 1 h at 25°C and stained overnight at 37°C with X-gal (1mg/ml) in PBS containing 2mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM potassium ferrocyanide, 5mM potassium ferricyanide, 0.2% NP-40 and 0.1% sodium deoxycholate.

### Expression Analysis

Total RNA extracted from tissues of F1 offspring of CD11b-Cre founders were subjected to RT-PCR using primers listed in Table 1. Specificity of the PCR products was confirmed following Southern blot analysis using labeled probes for Cre cDNA and  $\beta$ -actin as control (Table 1).

### **FACS analysis**

For flow cytometry analysis, tissues and cell samples were isolated from 4 to 8 week-old mice derived from CD11b-Cre x Z/EG matings. Peritoneal cells were obtained following lavage with 2x3ml of PBS with 0.5% FBS, and single-cell suspensions from bone marrow, spleen and thymus were subjected to red blood cell lysis and stained with Phycoerythrin-conjugated antibodies against CD4, CD11b, Gr1 or B220 (BD Biosciences). Cells were analyzed on a Becton Dickinson FACScan Flow Cytometer, using a 480 nm laser for excitation, 530 nm emission for GFP, and 585 nm emission for Phycoerythrin. At least three different transgenic mice have been analyzed for each transgenic line. Genomic DNA extracted from the same cell sample used in FACS analysis and from testis, liver, kidney, brain, heart and lung from CD11b-Cre/Z/EG double transgenic mice was digested with *NheI* and analysed by Southern blot using a EGFP cDNA radiolabeled probe. In this assay, the non-recombined Z/EG transgene corresponds to a ~11 kb band, while the recombined locus (deleted *lacZ* gene) corresponds to a ~6 kb band. The level of Cre-mediated recombination was estimated following quantification of the respective bands with ImageQuant software.

### **Brain tissue processing**

6 week-old progeny from CD11b-Cre/Z/EG transgenic mice from line A were anesthetized and perfused with 20 ml of PBS, followed by ice-cold 4% paraformaldehyde in PBS, pH 7.4, over 10 min. Brains were removed, postfixed for 1 hr at 4°C, and then incubated in 10% and 15% sucrose in PBS. Tissues were embedded in OCT (Tissue-Tek) and 10 µm sections through the entire brain were generated. Slides were incubated with DAPI, mounted in Fluor Save (Calbiochem) and images captured using epifluorescence (Axiovert).

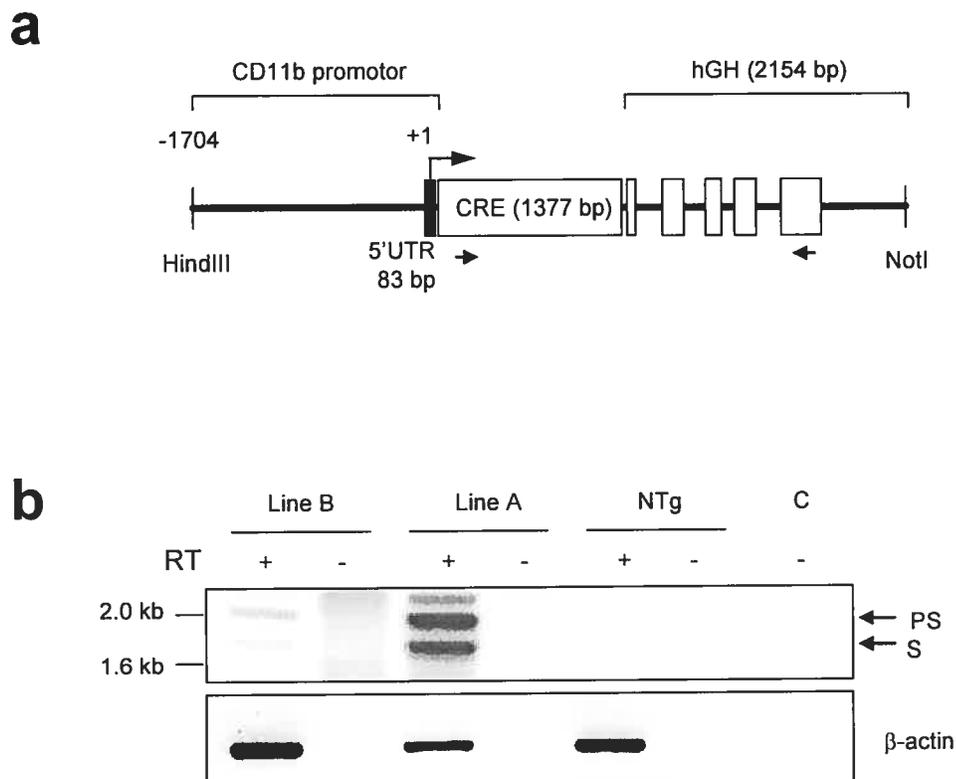
### ***Ex-vivo* osteoclast differentiation**

Osteoclast like cells (OCLs) were generated *in vitro* by coculturing new-born primary FVB/NJ calvaria osteoblasts and bone marrow (BM) isolated from 4-8 weeks old

CD11b-Cre/Z/EG double transgenic mice in  $\alpha$ -MEM containing 10% FBS,  $10^{-8}$  mol/L 1,25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> and  $10^{-6}$  mol/L prostaglandin E<sub>2</sub> (Rajapurohitam et al., 2001). After 6-8 days of culture, osteoblasts were removed following 0.1% collagenase/0.2% dispase treatment. EGFP positive live osteoclasts were detected by epifluorescence (Axiovert), and then fixed in 4% paraformaldehyde and subjected to TRAP staining (Rajapurohitam et al., 2001).

## ACKNOWLEDGMENTS

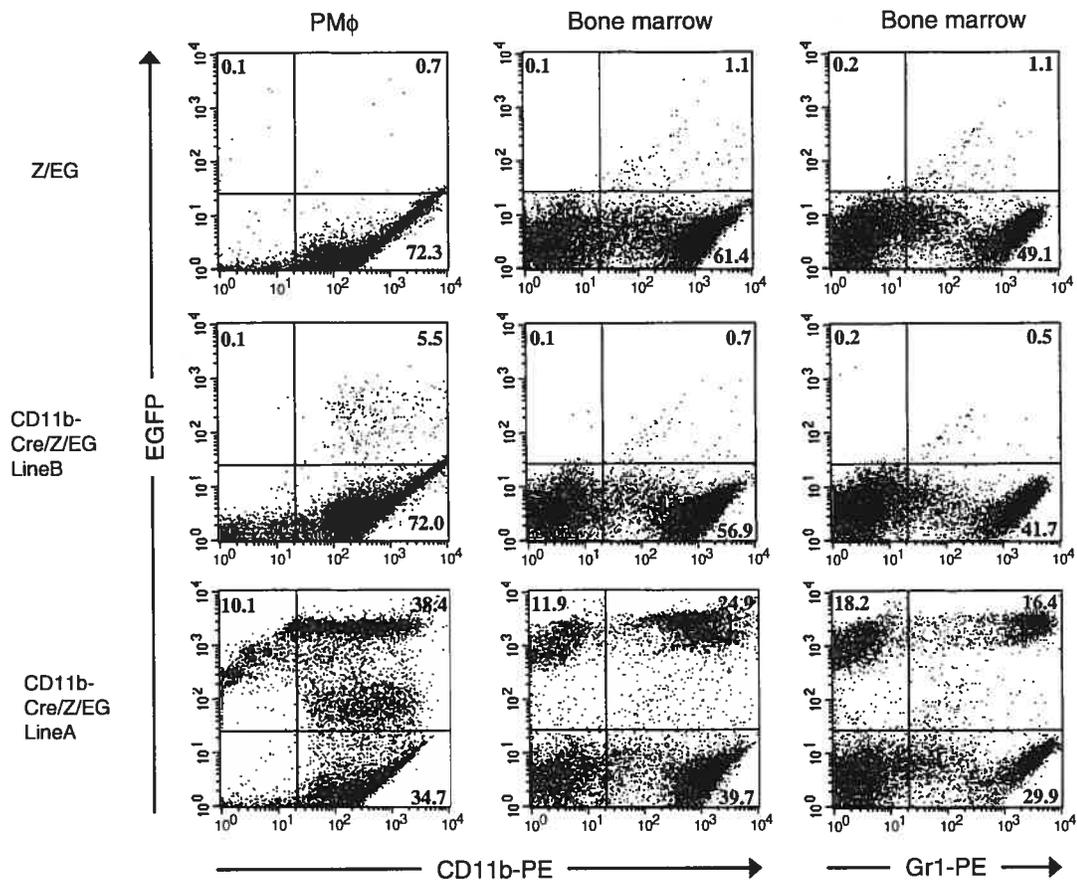
We thank D. Tenen for the CD11b promotor, C. Lobe and A. Nagy for the Z/EG mice, and A. Makrigiannis for critical reading of the manuscript. This work was supported by a National Sciences and Engineering Council of Canada grant (OPG0155277) to J.V. M.F. is supported by a doctoral training award from the Canadian Institutes of Health Research.



**Figure 4-1.**

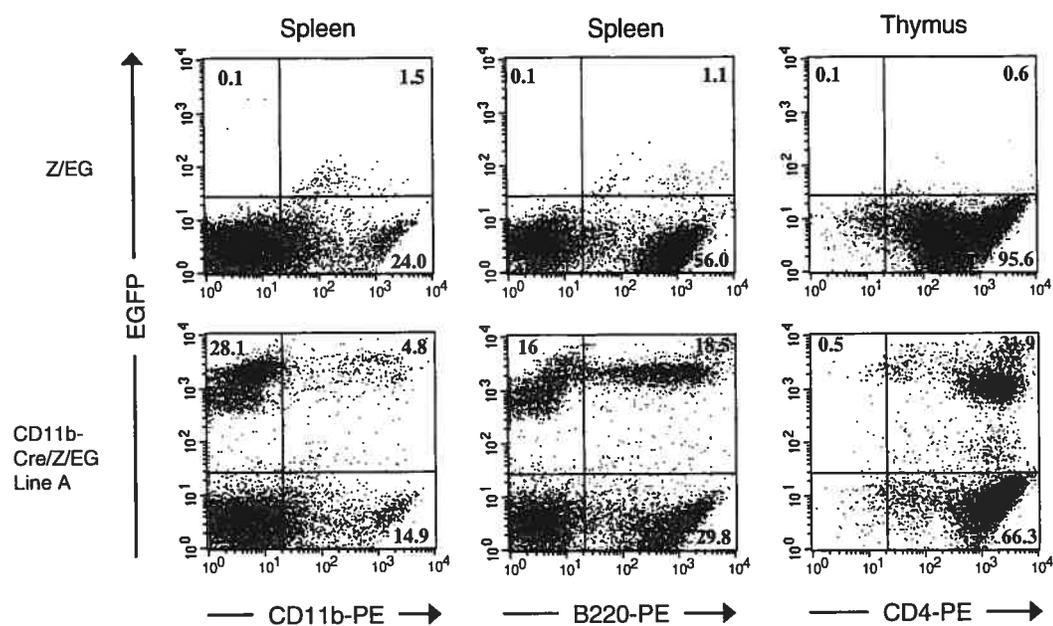
**a:** Schematic representation of the construct used to generate CD11b-Cre transgenic mice. The 1377 bp Cre cDNA were cloned downstream of the 1787-bp CD11b promoter fragment which included the transcription start site (arrow at +1) and 83-bp 5'UTR (black box). Downstream the 2.1-kb of the human growth hormone (hGH) gene includes exons (white boxes) and a polyadenylation signal. Primers used in RT-PCR analysis are represented by small arrows (see Table 1 for primers sequences).

**b:** Expression of the transgene was detected in peritoneal cells by RT-PCR in two different transgenic lines. The two specific ~2kb (partially spliced) and 1.8kb (spliced) transcripts were only present in transgenic mice.  $\beta$ -actin RT-PCR was used as control. NTg: non-transgenic control; RT +/-: presence or absence of reverse transcriptase enzyme; C: negative PCR control; PS: partially spliced; S: spliced.



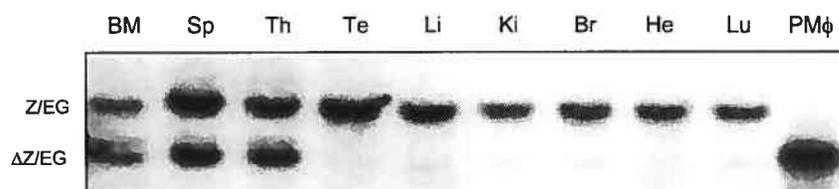
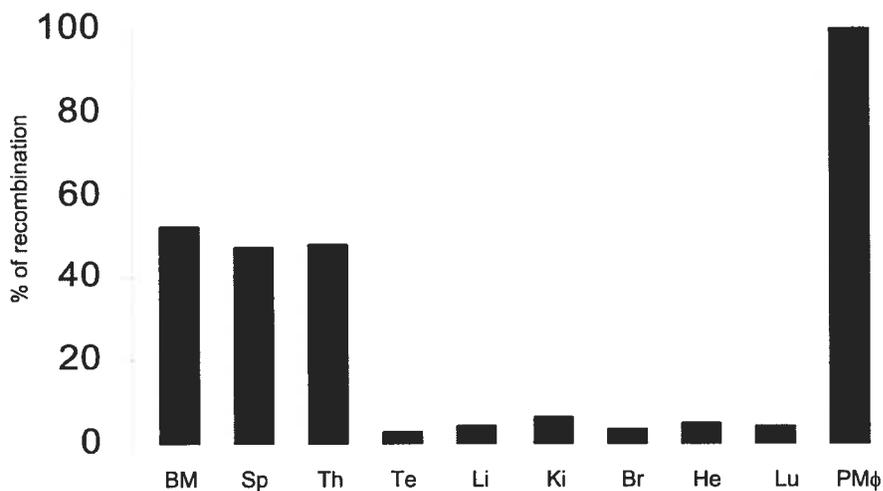
**Figure 4-2. Quantification of EGFP expression in myeloid cells by FACS analysis.**

Peritoneal macrophages (PM $\phi$ ) and bone marrow cells from CD11b-Cre/Z/EG mice (lines A and B) were analyzed using single Z/EG transgenic littermate cells as control. Cells were sorted for EGFP expression and for either CD11b (mature myeloid cells) or Gr1 (granulocytes) expression. The percentage of cells in each quadrant is indicated.



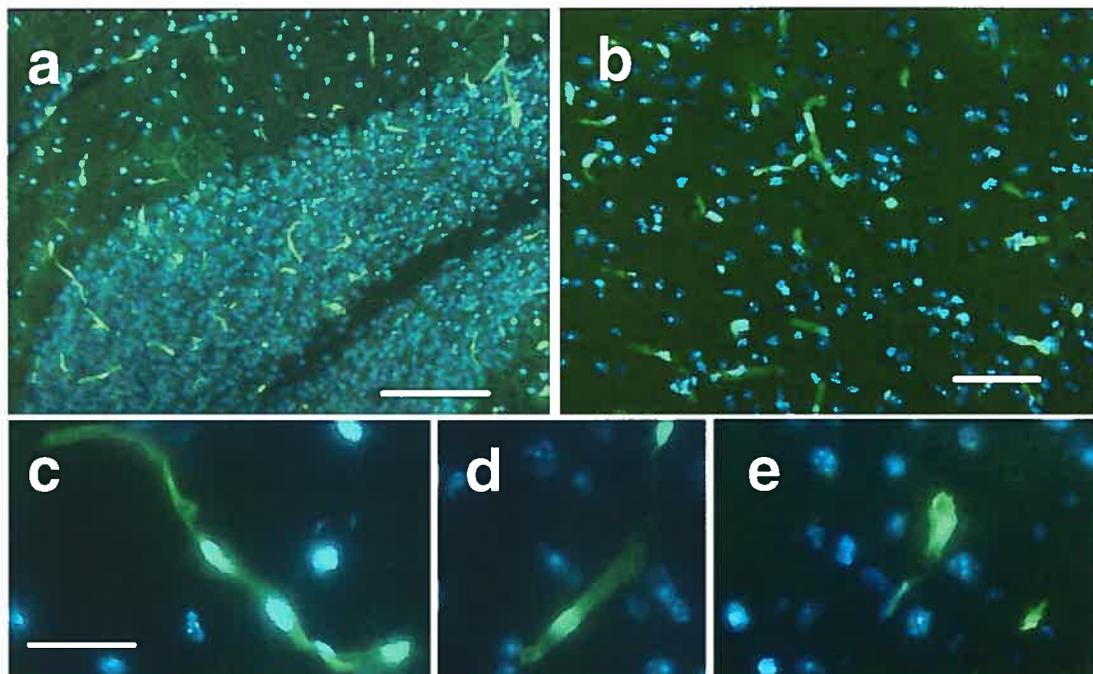
**Figure 4-3. Quantification of EGFP expression in lymphoid cells by FACS analysis.**

Spleen and thymus cells from CD11b-Cre/Z/EG mice (line A) were analyzed using Z/EG single transgenic littermate cells as control. Cells were sorted for EGFP expression and for either CD11b (mature myeloid cells), B220 (B lymphocytes) or CD4 (T lymphocytes) expression following antibodies staining. The percentage of cells in each quadrant is indicated.

**a****b**

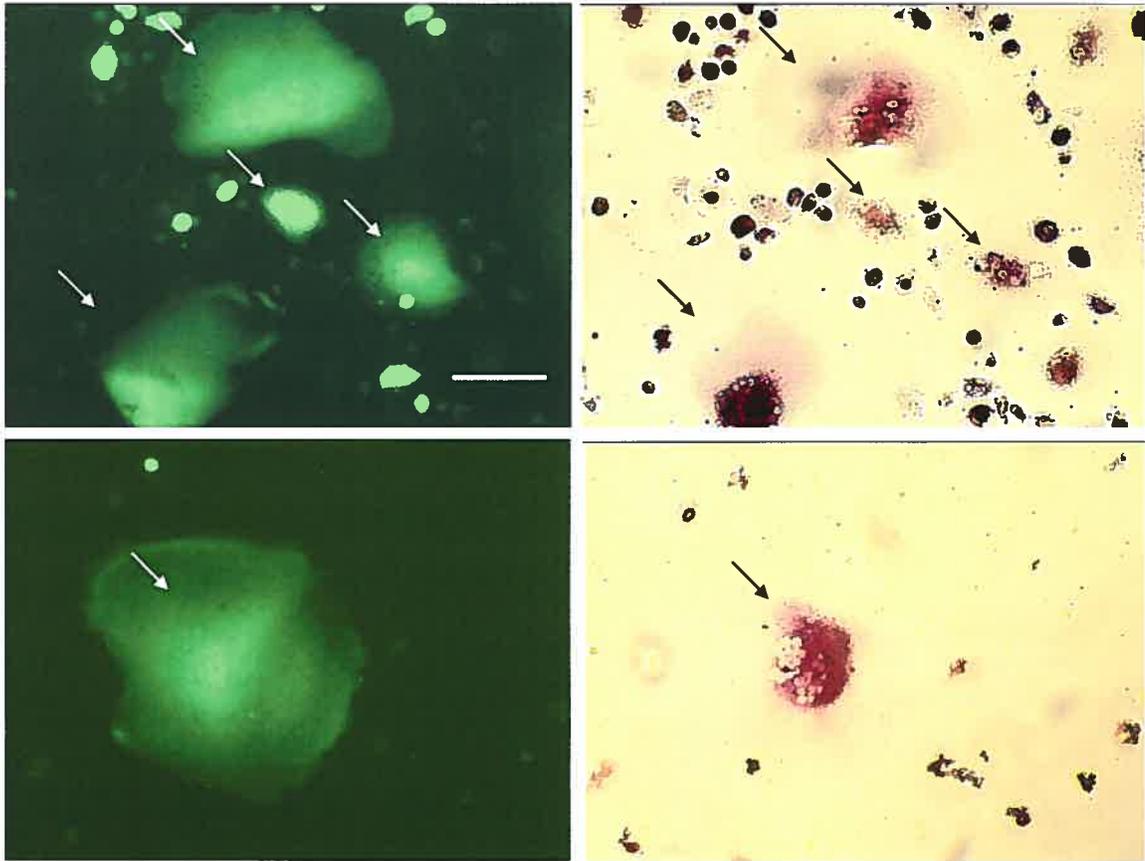
**Figure 4-4. Specificity and frequency of recombination in different CD11b-Cre/Z/EG line A double transgenic tissues.**

**a:** Southern blot analysis of genomic DNA isolated from several CD11b-Cre/Z/EG tissues, digested with *NheI* and hybridized with a EGFP cDNA probe (Z/EG: non-recombined allele; ΔZ/EG: recombined allele). **b:** Histogram representation of the recombination percentage for each tissue. (BM : bone marrow; Sp : spleen; Th : thymus; Te : testis; Li : liver; Ki : kidney; Br : brain; He : heart; Lu : lung; PMφ : peritoneal macrophages).



**Figure 4-5. Detection of Cre mediated recombination in microglial cells from CD11b-Cre/Z/EG line A double transgenic, in cerebellum.**

(a) and in brain cortex (b). Distinct microglia-like morphology found in CD11b-Cre/Z/EG brain : bipolar elongated cell (c), rod cell (d) and amoeboid (e). Scale bars: a, 100  $\mu\text{m}$ ; b, 50  $\mu\text{m}$ ; c-e, 25  $\mu\text{m}$ .



**Figure 4-6. *Ex-vivo* production and characterization of osteoclasts derived from CD11b-Cre/Z/EG line A double transgenic mice.**

Bone marrow cells were co-cultured for 6-8 days with primary osteoblasts. After removal of osteoblasts, mature multinucleated osteoclasts (arrows) were detected as double-positive cells for EGFP (left panels) and TRAP expression (right panels). Scale bars : 100  $\mu$ m

**Table 4-1 : PCR primer pairs used for transgenic mice screening and in RT-PCR assay.**

Gene	Primers	Length	Encoding nucleotides
Cre recombinase (Transgene construct)	Fwd: 5' TCATAGATCTCGACCATGCCCAAGAAG 3' Rev: 5' TCATAGATCTCGACAATTCCAACCTTAC 3'	1377 pb	-5 to 1377 pb
Cre recombinase (Transgenic screening)	Fwd: 5' AATGCTTCTGTCCGTTTGC 3' Rev: 5' CGGCAACACCATTTTTTCTG 3'	617 pb	150 to 766 pb
Cre recombinase/hGH (RT-PCR)	Fwd: 5' AATGCTTCTGTCCGTTTGC 3' Rev: 5' AATGTCTCGACCTTGCCATG 3'	1877 pb (spliced)	150 (Cre) to 1472 (hGH) pb
$\beta$ -actin (RT-PCR)	Fwd: 5' CAACGGCTCCGGCATGTGC 3' Rev: 5' GAAGGTCTCAAACATGATCTGGGAC 3'	349 pb	32 to 380 pb

**REFERENCES**

- Back A, East K, Hickstein D. 1995. Leukocyte integrin CD11b promoter directs expression in lymphocytes and granulocytes in transgenic mice. *Blood* 85:1017-1024.
- Beller DI, Springer TA, Schreiber RD. 1982. Anti-Mac-1 selectively inhibits the mouse and human type three complement receptor. *J Exp Med* 156:1000-1009.
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. 2003. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423:337-342.
- Chiu WS, McManus JF, Notini AJ, Cassady AI, Zajac JD, Davey RA. 2004. Transgenic mice that express Cre recombinase in osteoclasts. *Genesis* 39:178-185.
- de Boer J, Williams A, Skavdis G, Harker N, Coles M, Tolaini M, Norton T, Williams K, Roderick K, Potocnik AJ, Kioussis D. 2003. Transgenic mice with hematopoietic and lymphoid specific expression of Cre. *Eur J Immunol* 33:314-325.
- Dziennis S, Van Etten RA, Pahl HL, Morris DL, Rothstein TL, Blosch CM, Perlmutter RM, Tenen DG. 1995. The CD11b promoter directs high-level expression of reporter genes in macrophages in transgenic mice. *Blood* 85:319-329.
- Fujikawa Y, Quinn JM, Sabokbar A, McGee JO, Athanasou NA. 1996. The human osteoclast precursor circulates in the monocyte fraction. *Endocrinology* 137:4058-4060.
- Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K. 1994. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265:103-106.

Hennet T, Hagen FK, Tabak LA, Marth JD. 1995. T-cell-specific deletion of a polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferase gene by site-directed recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:12070-12074.

Hess DC, Abe T, Hill WD, Studdard AM, Carothers J, Masuya M, Fleming PA, Drake CJ, Ogawa M. 2004. Hematopoietic origin of microglial and perivascular cells in brain. *Exp Neurol* 186:134-44

Nagy A. 2000. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26:99-109.

Novak A, Guo C, Yang W, Nagy A, Lobe CG. 2000. Z/EG, a double reporter mouse line that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated excision. *Genesis* 28:147-155.

Pahl HL, Rosmarin AG, Tenen DG. 1992. Characterization of the myeloid-specific CD11b promoter. *Blood* 79:865-870.

Priller J, Flugel A, Wehner T, Boentert M, Haas CA, Prinz M, Fernandez-Klett F, Prass K, Bechmann I, de Boer BA, Frotscher M, Kreutzberg GW, Persons DA, Dirmagl U. 2001. Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat Med* 7:1356-61.

Rajapurohitam V, Chalhoub N, Benachenhou N, Neff L, Baron R, Vacher J. 2001. The mouse osteopetrotic grey-lethal mutation induces a defect in osteoclast maturation/function. *Bone* 28:513-523.

Rickert RC, Roes J, Rajewsky K. 1997. B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res* 25:1317-1318.

Rosmarin AG, Weil SC, Rosner GL, Griffin JD, Arnaout MA, Tenen DG. 1989. Differential expression of CD11b/CD18 (Mo1) and myeloperoxidase genes during myeloid differentiation. *Blood* 73:131-136.

Sauer B, Henderson N. 1988. The cyclization of linear DNA in *Escherichia coli* by site-specific recombination. *Gene* 70:331-341.

Shalhoub V, Elliott G, Chiu L, Manoukian R, Kelley M, Hawkins N, Davy E, Shimamoto G, Beck J, Kaufman SA, Van G, Scully S, Qi M, Grisanti M, Dunstan C, Boyle WJ, Lacey DL. 2000. Characterization of osteoclast precursors in human blood. *Br J Haematol* 111:501-512.

**CHAPITRE 5. INACTIVATION CONDITIONELLE DU GÈNE INPP4B  
CHEZ LA SOURIS**

## 5.1. INTRODUCTION

Les études présentées au chapitre 3 suggèrent que l'inositol polyphosphate 4-phosphatase de type II est un régulateur important de la différenciation et de la fonction des ostéoclastes. Afin de confirmer ce rôle *in vivo* nous avons décidé d'inactiver le gène *Inpp4b* chez la souris. D'après les résultats présentés au chapitre 4, il apparaît que *Inpp4b* est exprimée dans la plupart des tissus. Considérant cette expression relativement ubiquiste d'*Inpp4b*, il était possible que l'inactivation complète de ce gène soit létale tôt dans le développement, ne permettant pas l'étude des phénotypes osseux chez ces souris. Afin d'éviter ce problème, nous avons décidé de générer un allèle conditionnel (floxed) de ce gène. Un tel allèle permet l'ablation de spécifique la partie du gène se situant entre deux sites *loxP* de reconnaissance et d'excision par la recombinaise Cre.

Il existe au moins trois différents isoformes de *Inpp4b* qui résultent d'épissages alternatifs et *Inpp4b* est un gène de 25 exons et couvrant environ 600 kb sur le chromosome 8 de la souris (voir chapitre 4). La longueur des introns ne permet pas de « floxer » plus de deux exons par un seul évènement de recombinaison. Il était donc impératif de faire un choix judicieux quant à l'exon à « floxer ». En se basant sur la mutation *weeble* dans *Inpp4a*, nous avons choisi d'insérer les sites *loxP* de part et d'autre de l'exon 11 d'*Inpp4b*.

Le mutant *weeble* (*wbl*) présente une délétion d'une paire de base dans l'exon 10 du gène *Inpp4a* (Nystuen et al., 2001). Cette mutation provoque un changement du cadre de lecture et l'apparition d'un codon non-sens (stop) prématuré à l'acide aminé 263 d'*Inpp4a*. La présence de ce codon non-sens semble responsable de l'absence d'ARNm de *Inpp4a* observée chez la souris *wbl*. Ces résultats suggèrent donc que l'exon 10 d'*Inpp4a* est inclus dans tous les isoformes de ce gène.

La structure des gènes *Inpp4a* et *Inpp4b* est remarquablement bien conservée. Ces deux gènes présentent le même nombre d'exons (25) et le même épissage alternatif en 3' qui génère les isoformes alpha et beta. L'exon 11 d'*Inpp4b* correspond à ce qui est décrit comme l'exon 10 d'*Inpp4a* qui est muté chez la souris *weeble*. L'exon 11 d'*Inpp4b* mesure 148 pb et ne contient donc pas un nombre entier de codons.

Ainsi, la délétion de l'exon 11 d'*Inpp4b* devrait entraîner un épissage entre l'exon 10 et l'exon 12, un changement du cadre de lecture et l'apparition d'un codon non-sens prématuré en position de l'acide aminé 233 dans l'exon 12. Une telle mutation serait très similaire à la mutation *weeble*. De plus, la présence de ce codon non-sens situé à plus de 50 pb de la jonction entre l'exon 12 et l'exon 13, devrait provoquer la dégradation du messager par un mécanisme de « non-sens mediated decay » (NMD)(Maquat, 2004).

Ce chapitre présente comment nous avons pu générer un allèle conditionnel d'*Inpp4b* en insérant les sites *loxP* de part et d'autre de l'exon 11 de ce gène. Des résultats préliminaires concernant les phénotypes des souris déficientes en *Inpp4b* sont également présentés.

## 5.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Génération des souris *Inpp4b<sup>n/n</sup>*, *Inpp4b<sup>ΔΔ</sup>* et *Inpp4b<sup>lox/lox</sup>*

Un clone d'ADN génomique de souris 129/SV contenant l'exon 11 d'*Inpp4b* provenant d'une librairie de chromosome artificiel de bactérie (BAC) a été isolé par PCR tel que déjà décrit (Chalhoub et al., 2003). Une construction de ciblage (« targeting vector », voir figure 5.1) a été générée à partir de fragments provenant de ce clone et d'un vecteur contenant deux sites *loxP* et une cassette de sélection à la néomycine (NEO) flanquée de deux sites *frt* reconnus par la recombinaison Flipase (Brown and Baltimore, 2003). Cette construction a été transfectée dans des cellules ES qui ont ensuite été sélectionnées en présence de G-418.

Les clones ainsi sélectionnés ont été analysés par buvardage Southern en utilisant des sondes externes situées en 5' (Probe 1) ou en 3' (Probe 2) de la construction (voir figure 5.1). Brièvement, la sonde en 5' a été préparée par PCR en utilisant les oligonucléotides suivants : FOR 5'-ACCCACTATGGAAATGTG-3' et REV 5'-CGACCTGATTTTTAACCACC-3', le produit est de ~900 pb. La sonde 3' a été préparée avec les oligonucléotides : FOR 5'-CACTCTAAATTCTCCTACGAG-3' et REV 5'-CATTTAAAATAAGGCTGTGGTCC-3', le produit est de ~600 pb. Pour l'essai 5', l'ADN génomique a été digéré par EcoRV et les bandes attendues étaient de ~11,5 kb pour l'allèle WT et ~7,5 kb pour l'allèle recombiné *neolox*. Pour l'essai 3', l'ADN a été digéré par BsrBI et séparé sur PFGE (pulse field gel electrophoresis) et les bandes attendues étaient de ~30 kb pour l'allèle WT et de ~17 kb pour l'allèle recombiné *neolox*.

Les clones ayant correctement intégrés la construction dans le locus d'*Inpp4b* ont été injectés dans des blastocystes C57BL/6J. Les mâles chimériques ont été croisés avec des femelles C57BL/6J afin de générer les souris F1 *Inpp4b<sup>n/+</sup>*. Le croisement de ces souris avec la souris transgénique CMV-Cre (un don du Dr D. Lhones) a permis

d'exciser *in vivo* l'exon 11 et la cassette NEO générant les souris *Inpp4b*<sup>*Δ11/+*</sup>. D'autre part, le croisement des souris *Inpp4b*<sup>*lox/+*</sup> avec la souris *knockin FLPeR* (un don de la Dre A. Pratt) qui exprime la recombinaison Flipase (Flp) à partir du locus ROSA26 (Farley et al., 2000), a permis d'enlever la cassette NEO et de générer les souris *Inpp4b*<sup>*lox/+*</sup>. Un croisement en retour (backcross) par la souche C57BL/6J a ensuite été entrepris pour chacune de ces trois lignées afin de placer ces mutations sur un fond génétiques pur.

### Génotypage par PCR des souris

Une fois les allèles *neolox*, *Δ11* et *lox* établis un essai PCR tétraplexe a été mis au point pour génotyper les souris. Un oligonucléotide sens (FOR) et trois oligonucléotides antisens (REV) ont été employés : FOR 5'-AGGATTATGCTCTAGTCCTG-3', NEOREV 5'-CACTTGTGTAGCGCCAAGTG-3', INTRON10-REV 5'-ACACCACATGAAGCTCAGTC-3' et INTRON11-REV 5'-AACATGGCCAGCTATCTGAG-3'. Les produits de PCR sont séparés sur un gel d'agarose 2%. Les tailles attendues des produits de PCR pour chaque allèle sont les suivantes : WT 682 pb, *Neolox* 321 pb, *Δ11* 500 pb et *lox* 778 pb.

### RT-PCR

Des préparations d'ARN total de tissus ont été réalisées à l'aide du réactif Trizol (Invitrogen). Après dosage au spectrophotomètre 0,5 µg d'ARN a été utilisé par réaction de reverse-transcription (RT). 1/20 de la réaction a ensuite été utilisé par réaction de PCR. Les oligonucléotides spécifiques pour *Inpp4aα*, *Inpp4aβ*, *Inpp4bα*, *Inpp4bβ* et pour *β-actine* sont décrits au chapitre 2 et 3. Les oligonucléotides utilisés pour *Il-15* sont : FOR 5'-CCTGGAATTGCAGGTTATTTTAC-3' et REV 5'-CCATACAACCTTTATTCCACATC-3'. Pour *Usp38* : FOR 5'-CAGTCATTGAACAGGACTTGG-3' et REV 5'-GACATGTTTGGCCACAAGTAT-3'. Pour l'essai exon 8 à exon 13 (E8-13)

d'*Inpp4b* les oligonucléotides sont : FOR 5'-AGCTTCCTGGGCTGTGCCAG-3' et REV 5'-AAGAGGACCCTGTTTCTTTG-3'.

### **Cultures d'ostéoclastes**

Pour toutes les cultures le milieu utilisé était du  $\alpha$ -MEM supplémenté par 10% de FBS. Les cultures de BMMC (monocytes dérivés de moelle osseuse) et d'ostéoclastes ont été effectuées tel que décrit au chapitre 2. Brièvement, les cellules isolées de la moelle ( $5 \times 10^6$ /pétri de 10 cm) sont cultivées pendant 6 jours dans 10% de surnageant de L-929 qui contient du M-CSF ou dans 100 ng/ml de M-CSF recombinant. Elles sont ensuite récoltées par un traitement à l'EDTA 1 mM/PBS. Les cellules obtenues ainsi sont considérées comme une population très pure de monocytes (BMMC) ou de préostéoclastes. Les ostéoclastes ont été générés en traitant les BMMC avec du M-CSF (10 ng/ml) et du RANKL (25 ng/ml) pendant 6 à 8 jours.

### **Immunobuvardage de type Western.**

Pour les stimulations, les BMMC ou les ostéoclastes ont été lavés au PBS et placés pendant 3 heures dans du milieu sans sérum contenant 0,1 % BSA et 10 mM HEPES pH 7.6. Les cellules ont ensuite été stimulées par l'ajout de M-CSF (100 ng/ml) ou de RANKL (100 ng/ml). Les extraits de protéiques (totaux et nucléaires) et les immunobuvardages ont été réalisés tel que décrit au chapitre 2.

### **Analyse des paramètres osseux par « microcomputed tomography » ( $\mu$ CT).**

Les fémurs de souris *Inpp4b*<sup>+/+</sup> et *Inpp4b* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  issues d'un croisement *Inpp4b*<sup>+/ $\Delta$</sup>  (F3 C57BL/6) x *Inpp4b*<sup>+/ $\Delta$</sup>  (F3 C57BL/6) (fond génétique : 87,5% C57BL/6) âgées de 8 semaines ont été fixés dans une solution de PBS/formaldéhyde 3,7 % pendant 2 jours. Un fémur par souris (n=3) a ensuite été analysé par  $\mu$ CT.

### 5.3. RÉSULTATS

#### **L'allèle *neolox* (*n*) d'*Inpp4b* est un allèle nul.**

Afin de générer un allèle conditionnel floxé d'*Inpp4b* une construction permettant l'intégration de deux sites *loxP* a été transfectée dans des cellules ES (Figure 5-1 A). La recombinaison de cette construction avec le locus *Inpp4b* dans les clones ES a été confirmée par buvardage Southern (Figure 5-1 B). Les clones positifs ont été injectés dans des blastocystes afin de générer des souris chimériques qui ont ensuite été croisées avec des souris C57BL/6J. L'analyse de la progéniture de ce croisement confirme la transmission de l'allèle *neolox* (*n*). Le croisement de souris *Inpp4b<sup>n/+</sup>* entre elles, nous a permis d'obtenir un certain nombre de souris homozygotes *Inpp4b<sup>n/n</sup>* (Figure 5-1 C et tableau 5-1). L'analyse de l'expression d'*Inpp4b* par RT-PCR révèle une baisse importante des niveaux d'ARNm détectés dans les tissus *Inpp4b<sup>n/n</sup>* par rapport aux tissus sauvages (*Inpp4b<sup>+/+</sup>*). L'expression des messagers codant pour les isoformes *Inpp4b $\alpha$*  et *Inpp4b $\beta$*  est presque indétectable dans le cerveau et le thymus des souris *Inpp4b<sup>n/n</sup>* (Figure 5-1 D). Un essai encadrant le site d'insertion (Exon8-Exon13) ne permet pas de détecter de produit d'amplification chez les souris *Inpp4b<sup>n/n</sup>*, suggérant que la présence de la cassette NEO ou des sites *loxP* affecte l'expression normale d'*Inpp4b*. L'expression des gènes *Il-15* et *Usp38* situés respectivement à ~200 kb en 3' et à ~300 kb en 5' du locus *Inpp4b* n'est pas affectée par l'allèle *neolox*, confirmant la spécificité de l'effet de cet allèle sur l'expression d'*Inpp4b*. L'analyse par Western montre que la protéine *Inpp4b* n'est pas exprimée dans les souris *Inpp4b<sup>n/n</sup>* dans tous les tissus où elle est normalement détectée (Figure 5-1 E). L'anticorps utilisé reconnaît la partie N-terminale d'*Inpp4b* codée par les exons 3 à 10. Ainsi, si une protéine tronquée d'environ 30 kDa était produite dans les souris *Inpp4b<sup>n/n</sup>* elle serait normalement détectée par cet anticorps, ce qui n'est pas le cas (Figure 5-2 D). L'ensemble de ces analyses confirme que l'allèle *neolox*, où une cassette NEO a été introduite chez la souris en aval de l'exon

11, est un allèle hypomorphe très fort qui pourrait même être considéré comme un allèle nul puisque aucune expression protéique n'est détectée.

### **Génération de l'allèle $\Delta 11$ et de souris *Inpp4b*-nulle.**

L'allèle  $\Delta 11$  ( $\Delta$ ) a été généré en croisant des souris *Inpp4b*<sup>+*n*</sup> avec la souris transgénique CMV-Cre qui permet l'expression ubiquiste de la recombinase Cre. La présence de la Cre devait permettre la recombinaison entre les deux sites *loxP* présents dans l'allèle *neolox* et résulter en la délétion de l'exon 11 et de la cassette NEO (Figure 5-2 A). La recombinaison du locus a été confirmée dans les souris *Inpp4b*<sup>+*n*</sup> CMV-Cre par Southern et par PCR (Figure 5.2 B et C). Les souris *Inpp4b*<sup>+ $\Delta$</sup>  ainsi obtenues ont été croisées par C57BL/6J afin d'éliminer le transgène CMV-Cre. Le croisement de souris hétérozygotes *Inpp4b*<sup>+ $\Delta$</sup>  entre elles, a permis la caractérisation d'un certain nombre de souris homozygotes *Inpp4b* <sup>$\Delta\Delta$</sup>  (Tableau 5-2). L'expression protéique d'*Inpp4b* n'est pas détectée dans les tissus provenant de ces souris (Figure 5-2 D et E). De plus, comme c'est le cas pour les souris *Inpp4b*<sup>+*n*</sup> nous n'avons pas détecté de forme tronquée d'*Inpp4b* chez les souris *Inpp4b* <sup>$\Delta\Delta$</sup> , confirmant qu'il s'agit bien d'un allèle nul.

### **L'allèle *lox* est un allèle conditionnel qui exprime normalement *Inpp4b*.**

Notre objectif initial était de générer un allèle conditionnel d'*Inpp4b*. Or, l'allèle *neolox* ne permet pas l'expression normale d'*Inpp4b* et ne peut donc être utilisée comme allèle conditionnel. Souvent dans de tels allèles hypomorphes, l'expression d'un gène est affectée par la présence de la cassette NEO dans un intron. Notre construction de ciblage comprend deux sites *frt* placés de part et d'autre de la cassette, permettant son excision en présence de la recombinase flipase (FLP). Nous avons donc décidé d'exciser *in vivo* la cassette NEO en croisant les souris *Inpp4b*<sup>+*n*</sup> avec la souris *FLPeR*<sup>ki/ki</sup> qui est un « knockin » du gène codant pour Flp dans le locus *ROSA26* (Farley FW 2000). La recombinaison entre les sites *frt* et l'obtention de l'allèle *lox* dans les souris *Inpp4b*<sup>+*n*</sup> *FLPeR*<sup>+*ki*</sup> ont été confirmées par Southern et

PCR (Figure 5-3 B et C). Les souris *Inpp4b*<sup>+/*lox*</sup> ont été croisées entre elles afin de générer des souris homozygotes *Inpp4b*<sup>*lox/lox*</sup> (Tableau 5-3). De façon remarquable, contrairement à ce qui est observé dans les souris *Inpp4b*<sup>*n/n*</sup> et *Inpp4b* <sup>$\Delta\Delta$</sup>  l'expression d'*Inpp4b* n'est pas affectée dans les souris *Inpp4b*<sup>*lox/lox*</sup> (Figure 5-3 D). Ce résultat démontre que l'allèle *lox* peut être utilisé comme allèle conditionnel d'*Inpp4b* puisqu'en absence de Cre il permet l'expression normale de ce gène.

#### **Absence de phénotype apparent chez les souris adultes *Inpp4b* <sup>$\Delta\Delta$</sup> et *Inpp4b*<sup>*n/n*</sup>.**

Les souris homozygotes *Inpp4b* <sup>$\Delta\Delta$</sup>  et *Inpp4b*<sup>*n/n*</sup> génotypées au moment du sevrage (~3 semaines) paraissent normales. Notamment, le poids des souris déficientes en *Inpp4b* est comparable au poids des souris sauvages entre 3 et 16 semaines. Un examen visuel et histologique attentif, mais non exhaustif, de plusieurs tissus et organes, incluant poumon, cerveau, testicule, rate, cœur, thymus, tube digestif, a confirmé l'absence de phénotype apparent. Aucun trouble locomoteur majeur n'a été observé. Aucune mort post-sevrage n'a été détectée et des souris *Inpp4b*<sup>*n/n*</sup> âgées de près de 12 mois survivent encore dans notre animalerie. Plusieurs nouveaux nés ont été obtenus par le croisement de souris *Inpp4b*<sup>*n/n*</sup> entre elles ou par le croisement d'un mâle *Inpp4b*<sup>*n/n*</sup> par une femelle *Inpp4b*<sup>*n/n*</sup> (Tableau 5-1). *Inpp4b* n'est donc pas essentielle à la reproduction et à l'allaitement chez la souris.

L'analyse par cytométrie en flux (FACS) de certaines populations de cellules hématopoïétiques de la rate, du thymus et de la moelle osseuse n'a pas permis de mettre en évidence de défauts importants dans les souris *Inpp4b* <sup>$\Delta\Delta$</sup>  et *Inpp4b*<sup>*n/n*</sup>. Ces analyses ont cependant été réalisées sur un fond génétique mélangé (25% 129SV, 75% C57BL/6). Les croisements en retour (backcross) pour les allèles  $\Delta 11$  et *neolox* sont en cours et permettront bientôt de placer ces mutations sur un fond génétique pur C57BL/6 (F7) et éventuellement C3H.

### **Mort embryonnaire ou périnatale chez les souris *Inpp4b*<sup>ΔΔ</sup> et *Inpp4b*<sup>n/n</sup>.**

L'analyse du nombre de souris obtenues pour chacun des croisements et des % de chacun des génotype attendus a révélée que le nombre de souris homozygotes *Inpp4b*<sup>ΔΔ</sup> et *Inpp4b*<sup>n/n</sup> était inférieur au pourcentage attendu de 25% (Tableaux 5-1 et 5-2). De façon remarquable, le pourcentage de souris *Inpp4b*<sup>ΔΔ</sup> observées au moment du sevrage décroît à mesure que la pureté du fond génétique C57BL/6 s'accroît. Ainsi un croisement F2 x F2 (~75 % C57BL/6) génère 23 % de souris *Inpp4b*<sup>ΔΔ</sup>, alors qu'un croisement F3 x F3 (~88 % C57BL/6) en génère 18,5 % et qu'un croisement F4 x F4 (~94 % C57BL/6) en génère seulement 14 %. Le même phénomène est observé pour l'allèle *neolox* dans le croisement *Inpp4b*<sup>+n</sup> F5 x F5 (~97 % pur) où seulement 13.5 % de souris *Inpp4b*<sup>n/n</sup> ont été observées. Ces observations suggèrent donc qu'une certaine proportion de souris homozygotes *Inpp4b*<sup>ΔΔ</sup> et *Inpp4b*<sup>n/n</sup> meurent *in utero* ou après la naissance avant l'âge de 3 semaines. De plus, cette proportion s'accroît avec la pureté du fond génétique C57BL/6, il est donc possible que ce phénomène de létalité prénatale ou postnatale présente une pénétrance incomplète à cause de gènes modificateurs issus du génome des cellules ES (129SV) et transmis lors du croisement initial de la chimère. Ce phénomène devra donc être étudié plus en détails lorsque ces deux mutations auront été placées sur un fond génétique pur. Notons que pour l'allèle conditionnel *lox* le ratio mendélien semble jusqu'à présent normal. Ce qui est en accord avec l'expression normale d'*Inpp4b* chez les souris *Inpp4b*<sup>lox/lox</sup>.

### **Étude de la densité osseuse chez les souris *Inpp4b*<sup>ΔΔ</sup>.**

Les résultats présentés au chapitre 2 suggèrent qu'*Inpp4b* serait impliqué dans la différenciation des ostéoclastes, mais également dans leur activité de résorption. Afin de vérifier le rôle joué par *Inpp4b* dans le maintien de l'homéostasie osseuse *in vivo*, nous avons procédé à l'analyse des paramètres osseux chez les souris *Inpp4b*<sup>ΔΔ</sup> par  $\mu$ CT (microcomputed tomography). Comme chez les humains, les mâles et les femelles présentent une densité osseuse différentes chez la souris (mâle > femelle),

les analyses ont donc été effectuées séparément pour les mâles et pour les femelles âgés de 8 semaines (Tableaux 5-4 et 5-5). La densité de l'os trabéculaire (BV/TV) est augmentée en moyenne de 27% chez les mâles *Inpp4b<sup>ΔΔ</sup>* par rapport aux mâles *Inpp4b<sup>+/+</sup>*. Chez les femelles la densité osseuse est augmentée en moyenne de 43 % chez les animaux *Inpp4b<sup>ΔΔ</sup>* par rapport aux contrôles *Inpp4b<sup>+/+</sup>*. Cependant, dû au nombre réduit d'échantillons analysés (n=3 par groupe) et à une variation dans les densités osseuses, plus particulièrement chez les animaux contrôles mâles, ces augmentations ne peuvent être considérées significatives pour l'instant ( $p = 0,07$  pour les femelles,  $p = 1,16$  pour les mâles). Par contre, chez les femelles *Inpp4b<sup>ΔΔ</sup>*, le nombre de trabécules par mm (Tb.N) est significativement augmenté par rapport aux contrôles (38%,  $p < 0,05$ ). L'espacement entre les trabécules (Tb.Sp) est aussi significativement réduit chez les femelles *Inpp4b<sup>ΔΔ</sup>* comparativement aux femelles *Inpp4b<sup>+/+</sup>* (-15%,  $p < 0,05$ ). Finalement, le SMI (structural model index), un indice mathématique de la densité osseuse est significativement réduit chez les femelles déficientes en *Inpp4b* ( $p < 0,05$ ), indiquant un os trabéculaire plus dense et potentiellement plus solide.

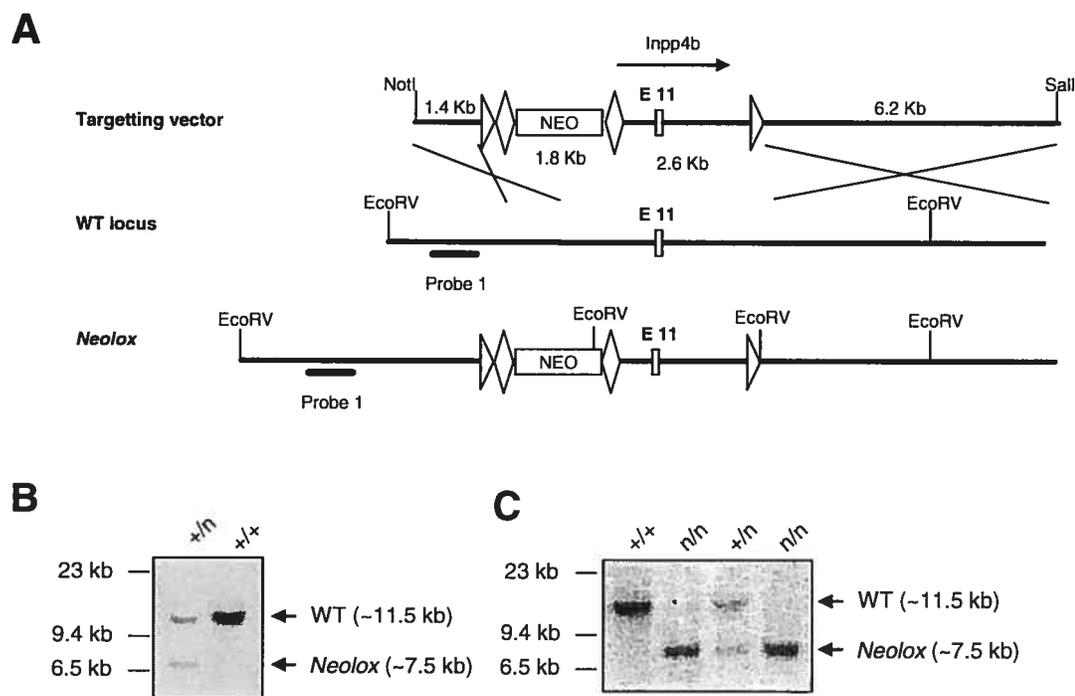
L'épaisseur de l'os cortical (C.Th) est aussi légèrement augmentée chez les mâles et les femelles *Inpp4b<sup>ΔΔ</sup>* par rapport aux groupes témoins, mais cette augmentation n'est pas pour l'instant statistiquement significative ( $p = 0,06$  pour les mâle,  $p = 0,25$  pour les femelles). Donc en général, ces mesures, effectuées sur un nombre très réduit d'échantillons, semblent indiquées que les animaux *Inpp4b<sup>ΔΔ</sup>* ont une densité osseuse plus importante. Un plus grand nombre d'échantillons et une analyse sur un fond génétique pur permettront sans doute d'obtenir des données significatives (voir discussion, chapitre 6).

### **Signalisation et différenciation dans les ostéoclastes *Inpp4b<sup>ΔΔ</sup>*.**

Considérant l'augmentation de densité osseuse observée chez les souris *Inpp4b<sup>ΔΔ</sup>*, la signalisation moléculaire activée par RANKL et M-CSF, a aussi été étudiée dans les

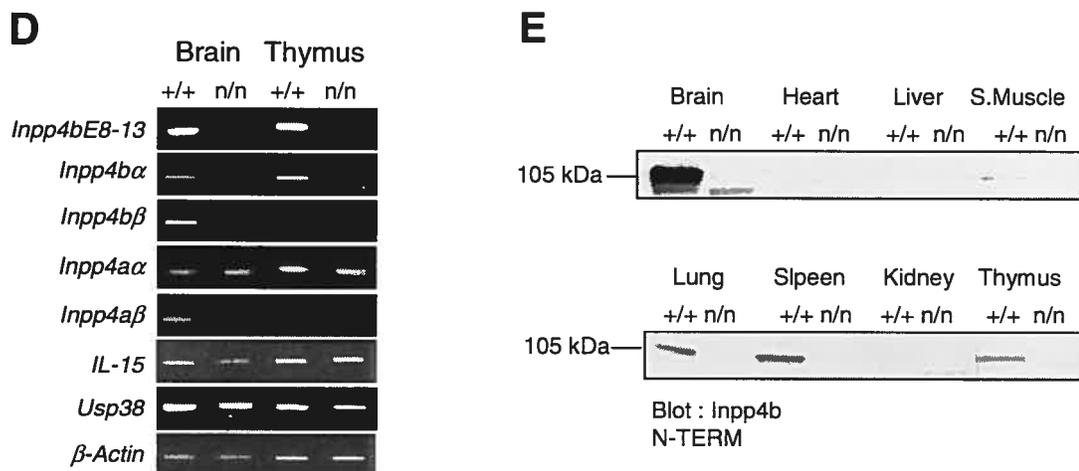
préostéoclastes et les ostéoclastes déficients en *Inpp4b*. D'abord, la phosphorylation de AKT, des MAPK ERK1/2 et p38, et la translocation nucléaire de NFκB en réponse au RANKL ont été vérifiées dans des préostéoclastes (BMSC) et dans des ostéoclastes matures (Figure 5-4 A). Aucune différence significative dans l'activation de ces différentes voies n'a pu être mise en évidence entre les cellules *Inpp4b<sup>ΔΔ</sup>* et *Inpp4b<sup>+/+</sup>*. L'induction du facteur de transcription NFATc1 ne semble pas non plus être affectée (Figure 5-4 B). Finalement, l'activation de AKT et des MAPK ERK1/2 et p38 en réponse au M-CSF, n'est pas sensiblement affectée par l'absence d'*Inpp4b* dans les préostéoclastes (Figure 5-4 C). Un nombre comparable d'ostéoclastes est obtenu *in vitro* lorsque des précurseurs *Inpp4b<sup>ΔΔ</sup>* ou *Inpp4b<sup>+/+</sup>* sont utilisés (résultat non montrés).

L'ensemble de ces résultats préliminaires suggère que la perte d'*Inpp4b* chez la souris affecte la densité osseuse, au moins chez les femelles, sans affecter la différenciation des ostéoclastes. Ces résultats semblent contredire notre étude dans les cellules RAW (chapitre 2), où la surexpression d'*Inpp4b* bloque l'activation de la voie de NFATc1 et la différenciation. De plus, dans les souris *gl* une réexpression d'*Inpp4b* accroît le phénotype ostéopérotique. On aurait donc pu s'attendre à ce que l'ablation d'*Inpp4b* provoque une différenciation accrue des ostéoclastes, ce qui ne semble pas être le cas, au moins *in vitro*. Une compensation de la perte d'*Inpp4b* par *Inpp4a* pourrait expliquer l'absence de phénotype de différenciation, d'autant plus qu'*Inpp4a* est exprimé dans les OCL (voir annexe 3). La surexpression d'une forme phosphatase inactive dans les RAW affecte la formation de l'anneau d'actine et réduit l'activité de résorption de ces cellules. Il est donc possible que l'ablation d'*Inpp4b* affecte plutôt l'activité de résorption *in vivo*. Des études plus poussées concernant l'activité des ostéoclastes *Inpp4b<sup>ΔΔ</sup>* devront être menées afin de clarifier ce point. Il est également possible que les ostéoclastes ne soient pas responsables du changement observé dans la densité osseuse chez les souris *Inpp4b<sup>ΔΔ</sup>* (voir discussion, chapitre 6).



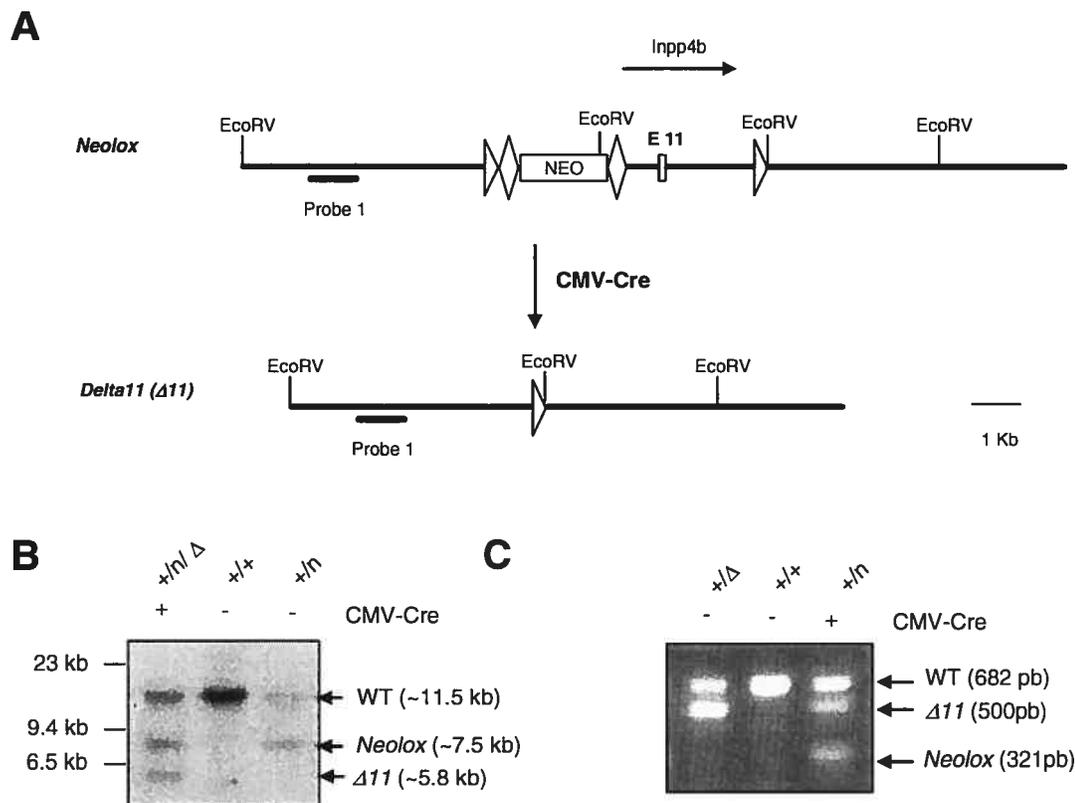
**Figure 5-1. Recombinaison dans les cellules ES et génération de l'allèle *neolox* et des souris *Inpp4b<sup>n/n</sup>*.**

**A :** Stratégie de ciblage du locus *Inpp4b*. La construction de ciblage (« Targeting vector ») est représentée en haut. Le locus *Inpp4b* sauvage (WT ou +) est représenté au milieu. L'allèle recombiné *neolox* (*n*) est représenté en bas. La cassette de résistance néomycine utilisée pour la sélection des clones recombinant est identifiée (NEO), de même que la position de l'exon 11 *floxed* (E11). Les sites *loxP* sont représentés par des triangles et les sites *frt* par des losanges. Les sites EcoRV et la position de la sonde en 5' (Probe 1) utilisés pour le génotypage par buvardage Southern sont également indiqués sur l'allèle WT et recombiné. **B :** Digestion par EcoRV d'ADN génomiques provenant de clones ES. Un buvardage Southern en utilisant la sonde 1 (Probe 1) permet d'identifier les clones ayant correctement intégrés le vecteur. La taille attendue des fragments de digestion pour chaque allèle est indiquée à droite. **C :** Génotypage de souris F2 provenant d'un croisement *Inpp4b<sup>+/n</sup>* par *Inpp4b<sup>+/n</sup>* par la même méthode décrite en (B).



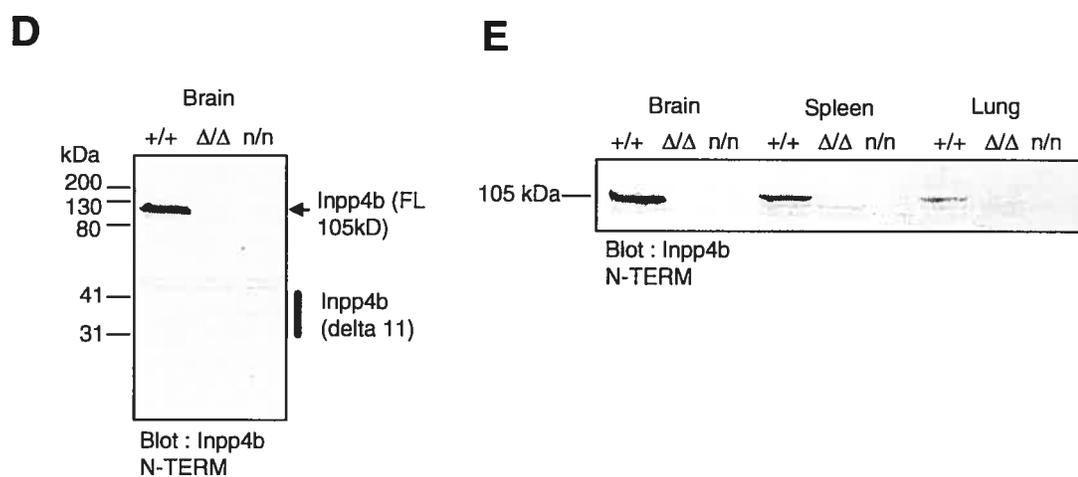
**Figure 5-1. (Suite)**

**D** : Analyse par RT-PCR de l'expression des isoformes alpha( $\alpha$ )et beta( $\beta$ ) d'Inpp4b et d'Inpp4a dans le cerveau (Brain) et le thymus (Thymus) des souris homozygotes *Inpp4b*<sup>+/+</sup> et *Inpp4b*<sup>n/n</sup>. L'expression des gènes contrôles *Il-15*, *Usp38* et *β-actin* est également montrée. **E** : Immunobuvardage de type Western présentant l'expression protéique d'Inpp4b dans différents tissus de souris *Inpp4b*<sup>+/+</sup> et *Inpp4b*<sup>n/n</sup>. L'anticorps polyclonale de lapin dirigé contre la partie N-terminale d'Inpp4b a été utilisé.



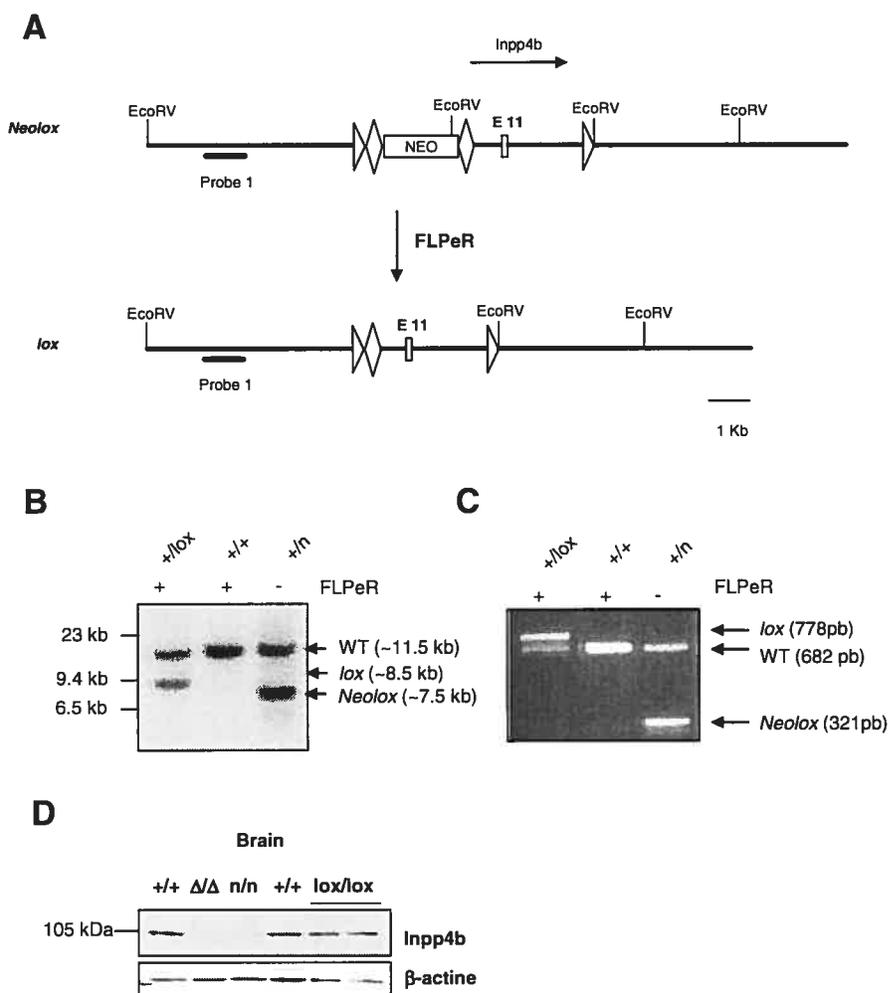
**Figure 5-2. Recombinaison *in vivo* dans la souris transgénique CMV-Cre et génération de l'allèle *delta11* ( $\Delta 11$ ) et des souris *Inpp4b* <sup>$\Delta/\Delta$</sup> .**

**A :** Représentation de l'évènement de recombinaison catalysé par la recombinaise Cre (pour les détails de la légende voir la figure 5.2 A). **B :** Analyse par Southern à partir d'ADN de queue de souris de la recombinaison dans les souris F1(CMV-Cre x *Inpp4b*<sup>+/*n*</sup>). Le génotype des souris, déterminé par PCR pour le transgène CMV-Cre, est indiqué en haut. La taille attendue des fragments de digestion pour chaque allèle est indiquée à droite. **C :** Génotypage par PCR de souris F2(CMV-Cre/*Inpp4b*<sup>+/*n*</sup> x C57BL/6). La transmission de l'allèle *delta11* ( $\Delta 11$ ) est observée dans la piste de gauche.



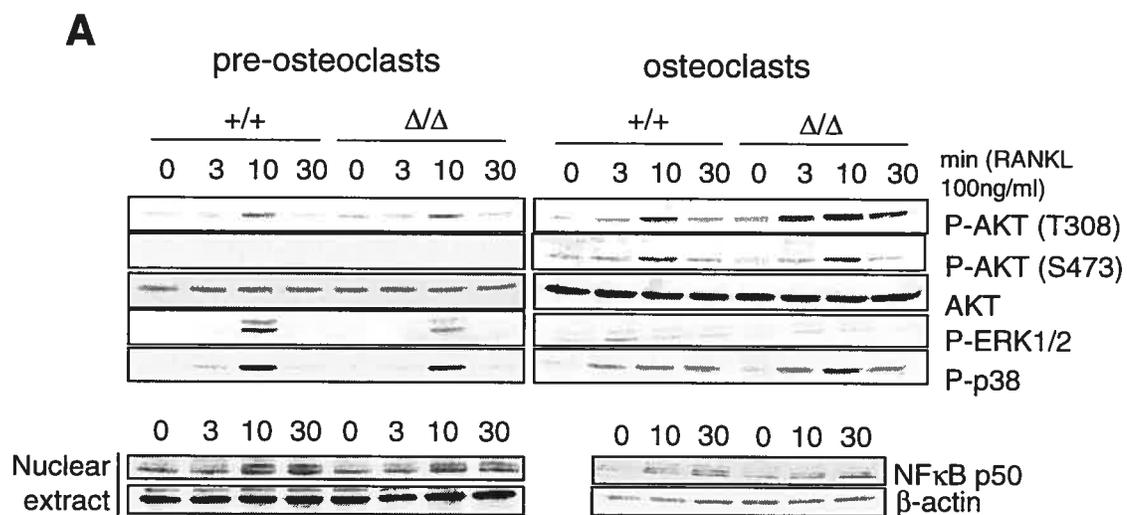
**Figure 5-2. (Suite)**

**D** : Immunobuvardage de type Western présentant l'expression protéique d'Inpp4b dans le cerveau des souris *Inpp4b*<sup>+/+</sup>, *Inpp4b* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  et *Inpp4b*<sup>n/n</sup>. L'anticorps polyclonale de lapin dirigé contre la partie N-terminale d'Inpp4b a été utilisé. L'absence de protéine tronquée à ~30 kDa est indiquée par une barre verticale (delta 11). **E** : Expression de la protéine Inpp4b dans différents tissus isolés de souris *Inpp4b*<sup>+/+</sup>, *Inpp4b* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  et *Inpp4b*<sup>n/n</sup>.



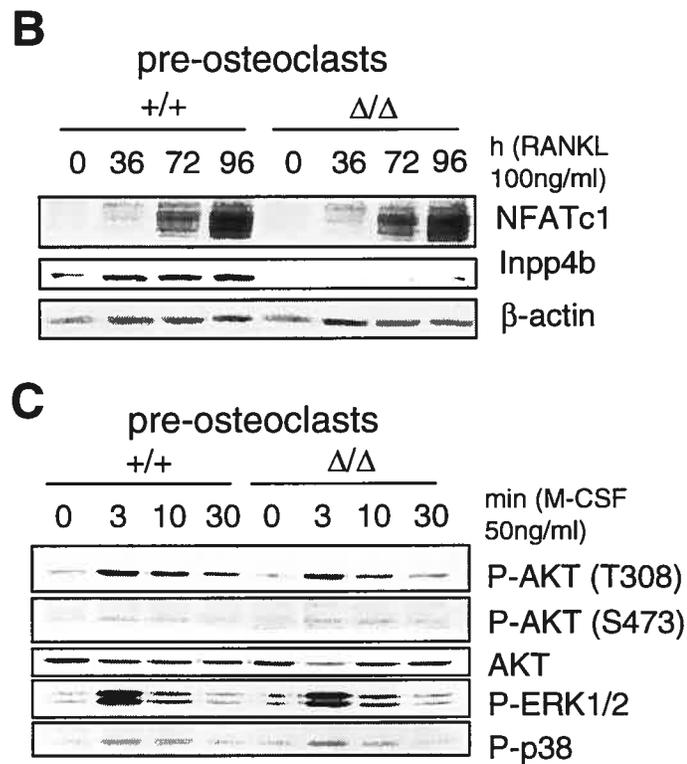
**Figure 5-3. Recombinaison *in vivo* dans la souris  $FLPeR^{+ki}$  et génération de l'allèle conditionnel  $lox$  et des souris  $Inpp4b^{lox/lox}$ .**

**A :** Représentation de l'évènement de recombinaison catalysé par la recombinase Flp (pour les détails de la légende voir la figure 5.2 A). **B :** Analyse par Southern à partir d'ADN de queue de souris de la recombinaison dans les souris  $F2(FLPeR^{+ki}Inpp4b^{+/n} \times C57BL/6)$ . Le génotype des souris, déterminé par PCR pour le knockin  $FLPeR$ , est indiqué en haut. La taille attendue des fragments de digestion pour chaque allèle est indiquée à droite. **C :** Génotypage par PCR de souris  $F2(FLPeR^{+ki}Inpp4b^{+/n} \times C57BL/6)$ . La transmission de l'allèle  $lox$  est observée dans la piste 1. **D :** Immunobuvardage de type Western présentant l'expression protéique d' $Inpp4b$  dans le cerveau des souris  $Inpp4b^{+/+}$ ,  $Inpp4b^{\Delta/\Delta}$ ,  $Inpp4b^{n/n}$  et  $Inpp4b^{lox/lox}$ . L'anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la partie N-terminale d' $Inpp4b$  a été utilisé. La membrane a été aussi hybridée avec un anticorps dirigé contre la  $\beta$ -actine ( $\beta$ -actin) afin de démontrer que des quantités comparables d'extraits protéiques avaient été chargées sur le gel.



**Figure 5-4. Analyse de la signalisation moléculaire dans les ostéoclastes *Inpp4b* <sup>$\Delta/\Delta$</sup> .**

**A :** Des préostéoclastes (BMMC) ou des ostéoclastes différenciés ont été déprivés de sérum pendant 3 heures, puis stimulés ou non au RANKL (100ng/ml) pour les temps indiqués, tel que décrit dans la section Matériels et Méthodes. Des extraits protéiques totaux (AKT, ERK et p38) ou nucléaires (NF $\kappa$ B p50) ont été préparés et séparés sur gel SDS-PAGE. Des immunobuvardages de types Western ont ensuite été réalisés successivement sur les mêmes membranes avec des anticorps phospho-spécifique (P-AKT, P-ERK et P-p38) ou avec des anticorps totaux (AKT).



**Figure 5-4. (Suite)**

**B :** Des BMMC provenant de souris *Inpp4b*<sup>+/+</sup> ou *Inpp4b* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  ont été traités ou non au RANKL (100ng/ml), dans un milieu avec sérum et M-CSF (10 ng/ml) pendant le nombre d'heures indiquées. Des extraits protéiques totaux ont ensuite été réalisés et l'expression de NFATc1 et d'*Inpp4b* a été vérifiée. La membrane a été aussi hybridée avec un anticorps dirigé contre la  $\beta$ -actine ( $\beta$ -actin) afin de démontrer que des quantités comparables d'extrait protéiques avaient été déposés sur le gel. **C :** Des préostéoclastes (BMMC) ont été traités sans sérum, puis stimulé ou non au M-CSF (100ng/ml) pour les temps indiqués, tel que décrit dans la section Matériel et Méthodes. Les immunobuvardages de type Western ont ensuite été réalisés comme en (A).

**Table 5-1. Allelic frequency in offspring from *Inpp4b*<sup>+n</sup> heterozygous intercrosses at various C57BL/6 backcross generation (F1 to F5).**

C57BL/6 Backcross	% with genotype indicated (No.)		
	+/+	+/neo	neo/neo
F1 (♂+/n x ♀+/n)	23 (14)	54 (32)	23 (14)
F2 (♂+/n x ♀+/n)	27.5 (8)	52 (15)	20.5 (6)
F2 (♂+/n x ♀n/n) <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	68.5 (13) <sup>a</sup>	31.5 (6) <sup>a</sup>
F4 (♂+/n x ♀+/n)	37.5 (12)	37.5 (12)	25 (8)
F5 (♂+/n x ♀+/n)	40 (11)	46 (13)	14 (4)
Expected %	25	50	25

<sup>a</sup> Homozygous n/n female crossed by +/n male. No +/+ progeny is expected and a ratio of 50% +/n and 50% n/n is expected.

**Table 5-2. Allelic frequency in offspring from *Inpp4b*<sup>+Δ</sup> heterozygous intercrosses at various C57BL/6 backcross step (F1 to F4).**

C57BL/6 Backcrosses	% with genotype indicated (No.)		
	+/+	+/Δ	Δ/Δ
F1 (♂+/Δ x ♀+/Δ)	ND	ND	ND
F2 (♂+/Δ x ♀+/Δ)	20 (9)	57 (25)	23 (10)
F3 (♂+/Δ x ♀+/Δ)	26 (21)	55.5 (45)	18.5 (15)
F4 (♂+/Δ x ♀+/Δ)	20 (4)	66 (14)	14 (3)
Expected %	25	50	25

**Table 5-3. Allelic frequency in offspring from *Inpp4b*<sup>+lox</sup> heterozygous intercrosses at various C57BL/6 backcross step (F1 and F2).**

C57BL/6 Backcross	% with genotype indicated (No.)		
	+/+	+/lox	lox/lox
F1 (♂+/lox x ♀+/lox)	ND	ND	ND
F2 (♂+/lox x ♀+/lox)	35 (7)	40 (8)	25 (5)
Expected %	25	50	25

**Table 5-4. Microcomputed tomography analysis of femur from control (+/+) and Inpp4b -/- ( $\Delta/\Delta$ ) 8 weeks old male and female mice.**

	Male		Female	
	+/+	$\Delta/\Delta$	+/+	$\Delta/\Delta$
BV/TV (%)	11.35 $\pm$ 4.72	14.39 $\pm$ 0.38	4.04 $\pm$ 0.48	5.76 $\pm$ 1.60
BV (mm <sup>3</sup> )	0.53 $\pm$ 0.29	0.68 $\pm$ 0.03	0.15 $\pm$ 0.02	0.21 $\pm$ 0.06
BS (mm <sup>2</sup> )	49.58 $\pm$ 20.91	58.32 $\pm$ 3.21	16.72 $\pm$ 2.45	23.75 $\pm$ 5.98
BS/BV (mm <sup>-1</sup> )	99.02 $\pm$ 12.12	86.21 $\pm$ 0.93	110.06 $\pm$ 6.51	111.37 $\pm$ 5.42
Tb.N (mm <sup>-1</sup> )	2.13 $\pm$ 0.73	2.61 $\pm$ 0.06	0.81 $\pm$ 0.10	1.19 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>
Tb.Th ( $\mu$ m)	52.48 $\pm$ 3.86	55.17 $\pm$ 0.29	49.62 $\pm$ 1.13	48.17 $\pm$ 1.97
Tb.Sp ( $\mu$ m)	199.18 $\pm$ 26.13	191.65 $\pm$ 9.27	336.34 $\pm$ 26.35	285.45 $\pm$ 28.51 <sup>a</sup>
C.Th ( $\mu$ m)	152.50 $\pm$ 9.01	170.83 $\pm$ 13.77	128.33 $\pm$ 15.06	140 $\pm$ 23.85

Data expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3 for each group)

KEY : BV/TV, bone volume fraction; BV bone volume; BS, bone surface; BS/BV, surface area to volume ratio; Tb.N, trabecular number; Tb.T, trabecular thickness; Tb.Sp, trabecular spacing. C.Th, cortical thickness.

<sup>a</sup>  $p < 0.05$  differente from control group value (+/+).

**Table 5-5. Nonmetric microarchitectural index of femur from control (+/+) and Inpp4b -/- ( $\Delta/\Delta$ ) 8 weeks old male and female mice.**

	Male		Female	
	+/+	$\Delta/\Delta$	+/+	$\Delta/\Delta$
SMI	2.14 $\pm$ 0.29	2.01 $\pm$ 0.06	2.57 $\pm$ 0.08	2.44 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
TBPf (mm <sup>-1</sup> )	25.67 $\pm$ 10.34	19.13 $\pm$ 0.21	38.13 $\pm$ 2.46	35.76 $\pm$ 3.56
DA	2.17 $\pm$ 0.54	1.94 $\pm$ 0.73	1.96 $\pm$ 0.09	1.90 $\pm$ 0.14

Data expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3 for each group)

KEY : DA, geometrical degree of anisotropy; SMI, structure model index; TBPf, trabecular bone pattern factor.

<sup>a</sup>  $p < 0.05$ , differente from control group value (+/+).

**CHAPITRE 6. DISCUSSION**

## 6.1. RÔLE D'INPP4B DANS DIFFÉRENCIATION DES OSTÉOCLASTES

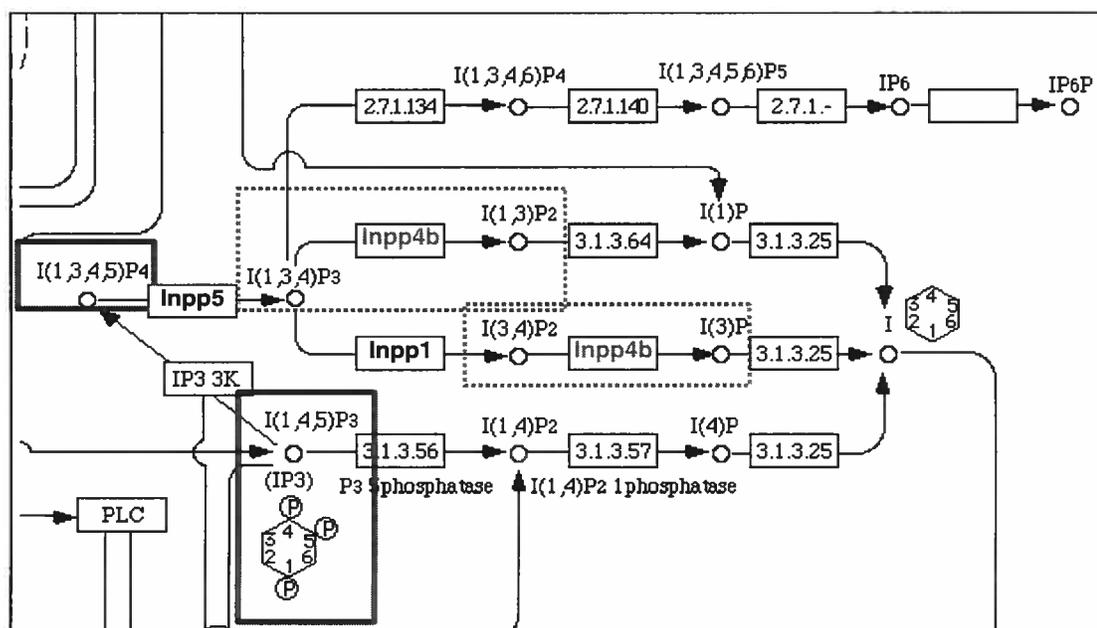
Les études que nous avons réalisées *in vitro* dans les cellules RAW 264.7 et *in vivo* dans les souris transgéniques TRAP-Inpp4b suggèrent un rôle pour Inpp4b dans le contrôle de la différenciation des ostéoclastes. La surexpression d'Inpp4b réduit le potentiel de différenciation des cellules RAW en présence de RANKL. De plus, dans les souris *gl/gl*, l'expression du transgène TRAP-Inpp4b résulte en une réduction du nombre d'ostéoclastes et en une augmentation de la masse osseuse.

La surexpression d'Inpp4b inhibe la translocation au noyau de NFATc1, ce qui résulte en un défaut dans l'expression de gènes spécifiques aux ostéoclastes comme *Ctsk* (Cathepsine K), *CtR* (récepteur de la calcitonine) et *Intb3* (intégrine  $\beta_3$ ). Inversement, la surexpression du mutant phosphatase-inactif d'Inpp4b (C845A) potentialise la translocation nucléaire de NFATc1 et n'affecte pas l'expression de ces gènes.

Il semble donc qu'Inpp4b aurait un effet négatif sur la voie d'activation du facteur de transcription NFATc1. Cet effet ne dépend pas de l'expression de NFATc1 lui-même, puisque des niveaux comparables de cette protéine sont observés quand Inpp4b est surexprimée ou non. On sait, d'autre part, que la translocation nucléaire de NFATc1 dépend de l'activation de la calcineurine, une phosphatase dépendante du calcium. Or, la relâche de calcium dans le cytoplasme est un processus qui est activé par la production d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) par la phospholipase C gamma (PLC $\gamma$ ). On peut supposer qu'Inpp4b agit au niveau de cette cascade signalétique.

Inpp4b peut déphosphoryler l'inositol 1,3,4-triphosphate et l'inositol 3,4-biphosphates des sous-produits de l'IP<sub>3</sub> (voir figure 6-1). Inpp4b pourrait donc avoir un effet négatif sur les concentrations de ces deux phosphoinositols et ainsi favoriser une dégradation plus rapide de l'IP<sub>3</sub>, affectant négativement la relâche de calcium

(voir figure 6-2). Afin de confirmer ces hypothèses, il serait important de mesurer les niveaux de calcium intracellulaire dans les cellules OCL surexprimant Inpp4b ou Inpp4b(C845A). Dans une approche plus complexe, faisant appel à des analyses biochimiques par HPLC (« high-performance liquid chromatography »), il serait aussi possible de mesurer les concentrations des divers phosphoinositols impliqués (Luo et al., 2003). Si Inpp4b agit bien sur cette voie, une diminution du calcium et de l'IP3 devrait être observée en présence d'Inpp4b, alors qu'une augmentation de ces deux métabolites devrait être détectée en présence du mutant Inpp4b(C845A).

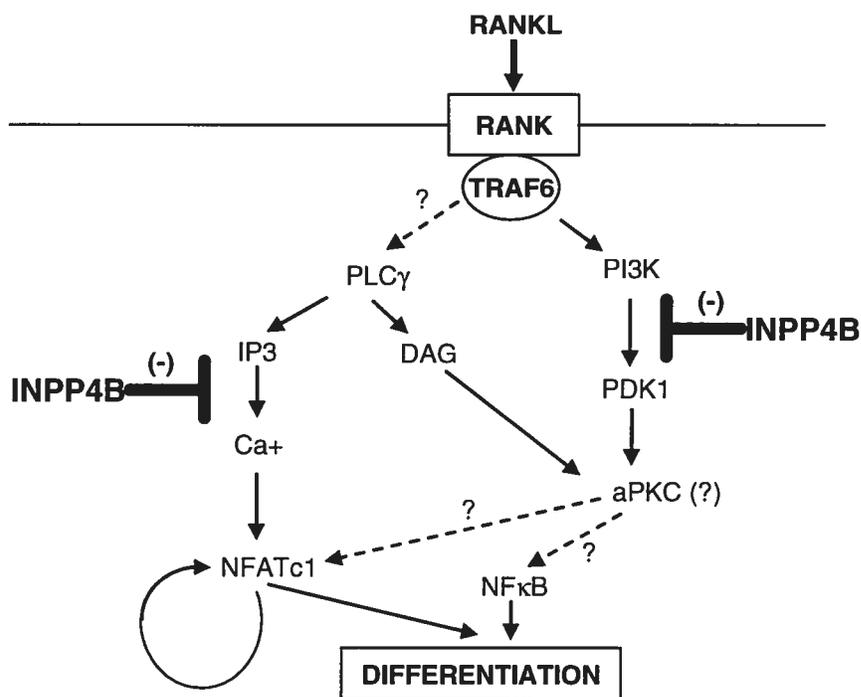


**Figure 6-1. Rôle potentiel d'Inpp4b dans la dégradation de l'IP<sub>3</sub> et la régulation de la relâche de calcium.**

L'IP<sub>3</sub> et l'IP<sub>4</sub> sont encadrés en bleu. Les enzymes impliquées dans la dégradation de l'IP<sub>3</sub> par la voie de l'IP<sub>4</sub> sont la IP<sub>3</sub> 3-kinase (IP<sub>3</sub> 3K), une inositol polyphosphate 5-phosphatase (Inpp5), l'inositol polyphosphate 1-phosphatase (Inpp1) et une inositol polyphosphate 4-phosphatase (possiblement Inpp4b). Adaptée de Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Pathway DMMU 04070. [www.genome.ad.jp/kegg/](http://www.genome.ad.jp/kegg/).

D'autres résultats non présentés dans le chapitre 2, suggèrent que Inpp4b serait impliquée dans le contrôle de l'activation d'au moins un isoforme de la protéine kinase C (PKC). Nous avons constaté que l'anticorps dirigé contre la thréonine 308

phosphorylée de AKT reconnaissait une autre bande à environ 85 kDa uniquement lorsque le mutant phosphatase inactive, Inpp4b(C845A), était surexprimé (voir annexe 1A). Cette bande n'est pas reconnue par un anticorps dirigé contre AKT non-phosphorylée, suggérant qu'il s'agit d'une autre protéine présentant un épitope similaire à la phospho-T308. La T308 de AKT correspond à un site de phosphorylation dans la boucle d'activation qui est très conservé à travers la famille des kinases AGC (protéine kinase A, G et C) qui inclut AKT, les PKC, PKA et p70S6K (voir Annexe 1B). D'après les tailles de ces diverses kinases, il apparaît que la bande à 85 kDa ne peut être qu'une PKC. Nous avons donc utilisé un anticorps reconnaissant toutes les PKC lorsqu'elles sont phosphorylées sur cet épitope (pan-phospho-PKC $\gamma$ T514). La bande à 85 kDa est également reconnue par cet anticorps, suggérant qu'elle correspond effectivement à une PKC phosphorylée sur cette thréonine.



**Figure 6-2.** Rôle potentiel d'Inpp4b dans le contrôle de l'IP3, du calcium, des PKC et de NFATc1 dans les ostéoclastes.

La thréonine de la boucle d'activation des kinases AGC, incluant la plupart des PKC, est phosphorylée par la phosphoinositide-dépendante kinase 1, PDK1 (Toker and Newton, 2000). Fait intéressant, PDK1 est elle-même activée par le phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PI3,4,5P<sub>3</sub>) et par le phosphatidylinositol 3,4-biphosphate (PI3,4P<sub>2</sub>), des produits de la PI3 kinase (Alessi et al., 1997). Le PI3,4P<sub>2</sub> est un substrat d'Inpp4b, il est donc possible que la surexpression le mutant phosphatase inactive Inpp4b(C845A) provoque l'accumulation de PI3,4P<sub>2</sub>, l'activation soutenue de PDK1 et la phosphorylation d'une ou plusieurs PKC (voir Figure 6.2).

Le rôle des PKC dans la différenciation des ostéoclastes n'est pas très clair. Récemment, les aPKC (« atypical PKC » : PKC $\lambda/\tau$  et PKC $\zeta$ ) ont été impliquées dans le contrôle de l'activation de NFATc1 et de NF $\kappa$ B. Des mutations dans p62, une protéine qui interagit avec les aPKC, sont associées à certaines formes de la maladie de Paget (Laurin et al., 2002). L'ablation du gène *p62* chez la souris n'a pas d'effet *in vivo* sur la masse osseuse, mais réduit l'ostéoclastogenèse *in vitro*. L'absence de p62 a un effet négatif important sur l'activation des voies de NFATc1 et de NF $\kappa$ B (Duran et al., 2004). Il serait important de vérifier si la ou les PKC activées par la surexpression du mutant Inpp4b(C845A) correspondent ou non aux aPKC. Si c'est le cas, Inpp4b pourrait donc être impliquée en tant que régulateur négatif de deux voies de signalisation qui convergent afin d'activer NFATc1, NF $\kappa$ B et la différenciation des ostéoclastes (Figure 6-2).

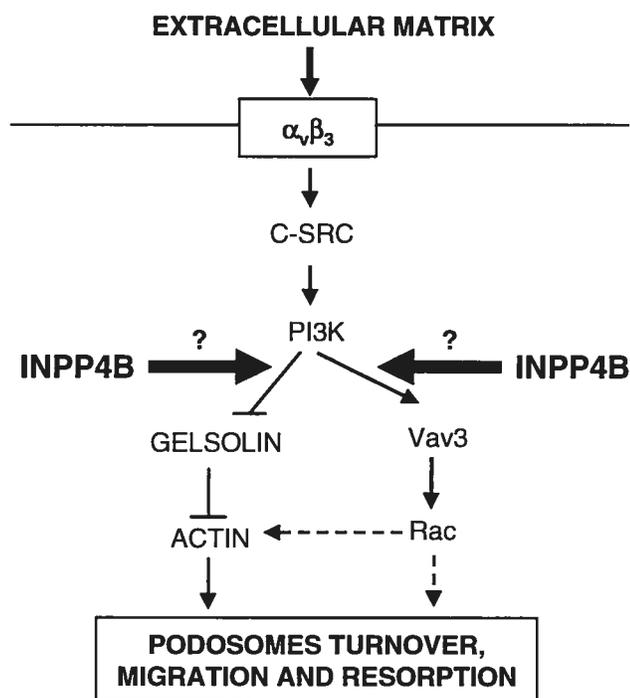
## 6.2. RÔLE D'INPP4B DANS L'ASSEMBLAGE DES PODOSOMES ET DANS LA RÉSORPTION OSSEUSE

Nous venons de voir de quelle façon Inpp4b pourrait comme inhibiteur de l'ostéoclastogenèse. Les résultats présentés dans cette thèse suggèrent que Inpp4b aurait aussi une fonction dans les ostéoclastes matures au niveau du contrôle de la formation des podosomes de l'anneau d'actine et de la résorption osseuse. Nous avons montré que la protéine Inpp4b était localisée au niveau de l'anneau d'actine et des podosomes dans les ostéoclastes matures. De plus, la surexpression du mutant phosphatase inactive Inpp4b(C845A) dans les cellules RAW induit la formation anormale de plusieurs petits anneaux d'actine ce qui entraîne une perte de l'activité résorptive de ces cellules.

L'ensemble de la littérature concernant le rôle de la PI3 kinase dans la formation des podosomes nous permet de proposer qu'Inpp4b pourrait être impliquée dans ce processus par au moins deux mécanismes (Figure 6-3).

Un premier mécanisme impliquerait la gelsoline. En effet, il a été montré que la gelsoline est recrutée à la membrane par sa liaison aux phosphoinositides  $PI4,5P_2$ ,  $PI3,4P_2$  et  $PI3,4,5P_3$  qui s'accumulent dans la membrane plasmique suite à la l'interaction de l'intégrine  $\alpha\beta3$  avec l'ostéopontine (Chellaiah and Hruska, 1996). Ce recrutement libère les extrémités des filaments d'actine et permet leur réorganisation. Il est donc possible que Inpp4b en diminuant la concentration de  $PI3,4P_2$  à la membrane contribue à mettre fin à ce signal (Figure 6-3). Dans ce cas, une réduction dans l'activité d'Inpp4b devrait provoquer un recrutement constitutif de la gelsoline à la membrane et une polymérisation accrue de l'actine. La surexpression du mutant inactif d'Inpp4b induit effectivement une accumulation anormale de podosomes dans les cellules RAW. Cependant, ces podosomes sont mal organisés puisqu'ils ne forment pas un seul anneau d'actine périphérique comme dans les

cellules contrôles, mais plusieurs petits anneaux à l'intérieur de l'ostéoclaste. Ces formations aberrantes seraient responsables du défaut de résorption observé dans ces cellules. Il a été montré que les podosomes sont des structures très dynamiques ayant une durée de vie moyenne de 2 minutes. De plus, la formation de groupement de podosomes, puis de petits anneaux internes précèdent la formation de l'anneau d'actine périphérique lors de la différenciation des cellules RAW en OCLs (Destaing et al., 2003). On peut donc penser que le dynamisme des podosomes et la formation de l'anneau d'actine dépend de l'action successive de régulateurs positifs comme la PI3 kinase et de régulateurs négatifs comme Inpp4b. La localisation d'Inpp4b au niveau des podosomes supporte ce modèle. Afin de confirmer cette hypothèse il serait important de vérifier par des méthodes biochimiques les fractions de gelsoline associée à l'actine ou aux phosphoinositides dans les cellules OCLs surexprimant Inpp4b ou le mutant Inpp4b(C845A) (Chellaiah and Hruska, 1996).



**Figure 6-3.** Rôle potentiel d'Inpp4b dans le contrôle de l'assemblage des podosomes, dans la migration et dans l'activité résorptive des ostéoclastes.

Un deuxième mécanisme ferait intervenir la petite GTPase Rac. Récemment, il a été montré que le Rho-GEF (« guanine nucleotide exchange factor ») Vav3 qui peut échanger le GDP pour du GTP et activer les GTPases de la famille Rho est essentiel à la formation de l'anneau d'actine et à l'activité résorptive des ostéoclastes (Faccio et al., 2005). En effet, l'activation de la GTPase Rac est compromise dans les ostéoclastes *Vav3*<sup>-/-</sup> qui présentent un défaut de formation de l'anneau d'actine et de résorption, suggérant un rôle particulier pour Rac dans la formation des podosomes. Les protéines Vav1, 2 et 3 possèdent un domaine PH et il a été montré que ce domaine lie le PI4,5P<sub>2</sub>, le PI3,4P<sub>2</sub> et le PI3,4,5P<sub>3</sub> (Han et al., 1998). Fait intéressant, la liaison de Vav1 au PI4,5P<sub>2</sub> inhibe son activité de GEF envers Rac, Rho et Cdc42, alors que le PI3,4P<sub>2</sub> ou le PI3,4,5P<sub>3</sub> stimulent son activité. Il est donc possible que Inpp4b en diminuant la quantité de PI3,4P<sub>2</sub> ait un effet négatif sur l'activation de Vav3 et de Rac dans les ostéoclastes (Figure 6-3). Afin de vérifier cette hypothèse il faudrait mesurer les concentrations en RacGTP et en RacGDP dans les cellules surexprimant Inpp4b ou le mutant inactif Inpp4b(C845A).

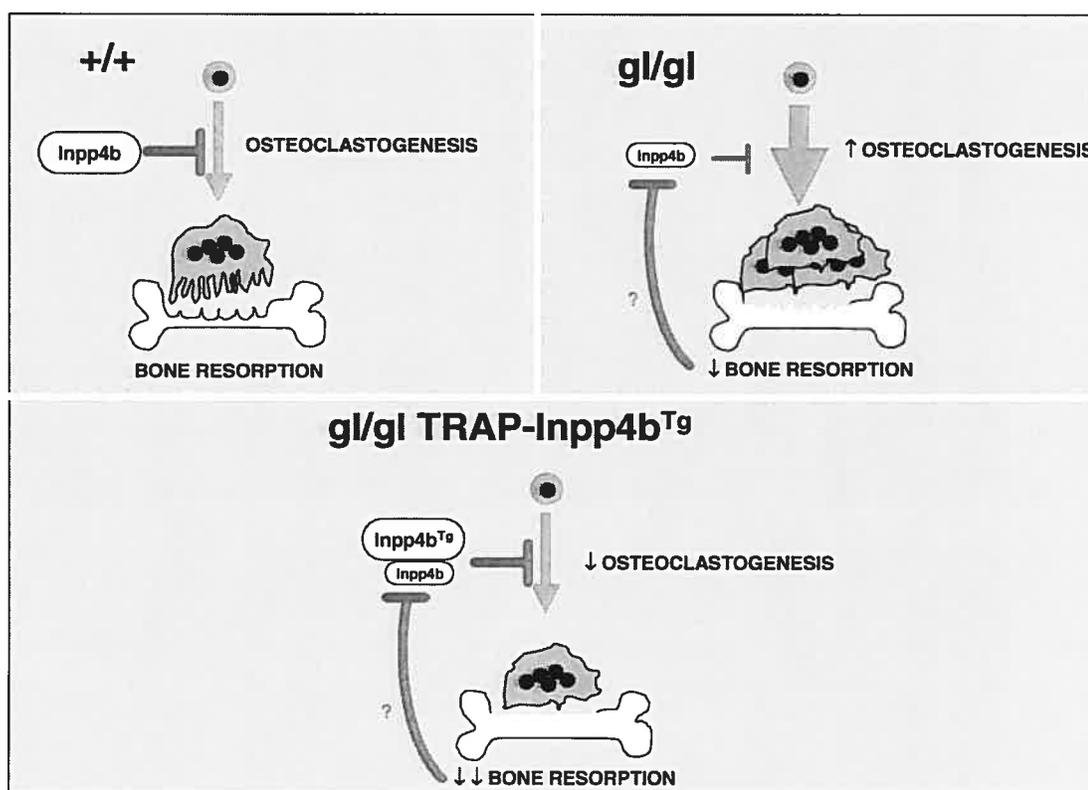
Nos résultats montrent donc qu'Inpp4b aurait deux fonctions dans les ostéoclastes : une fonction dans le contrôle de la différenciation et une fonction dans le contrôle de la formation des podosomes et dans la résorption. Une telle dualité de fonction pour une inositol phosphatase n'est pas unique à Inpp4b. Par exemple, PTEN, une inositol 3-phosphatase, bien connue comme un régulateur négatif de la réponse de croissance et de survie induite par la PI3 kinase (Sulis and Parsons, 2003), joue également un rôle important dans la migration cellulaire, plus particulièrement dans les processus de chimiotactisme (Janetopoulos et al., 2005; Liliental et al., 2000). L'étude de Kwon *et al.* faisant appel aux cellules RAW montre que cette dualité de PTEN s'applique également aux ostéoclastes (Kwon et al., 2001) (voir section 1.3.5.). La 5-phosphatase SHIP1 semble aussi être impliquée à la fois dans la différenciation et dans l'activité résorptive des ostéoclastes (Takeshita et al., 2002)(voir section 1.3.5.).

### 6.3. LA SOUS-EXPRESSION D'INPP4B CHEZ LA SOURIS GL : UN MÉCANISME COMPENSATOIRE?

Initialement, nous avons identifié *Inpp4b* comme un gène sous-exprimé dans les ostéoclastes *gl*. Notre laboratoire a déjà montré que les souris *gl/gl* présentent ~40% plus d'ostéoclastes *in vivo* que les souris sauvages (Rajapurohitam et al., 2001). Un mécanisme compensatoire pourrait être responsable de cette augmentation importante dans le nombre d'ostéoclastes. Nos résultats suggèrent que la baisse d'expression d'*Inpp4b*, un régulateur négatif de l'ostéoclastogenèse, ferait partie de ce mécanisme compensatoire. En effet, nous avons montré que la réexpression de ce gène dans les ostéoclastes *gl* par transgénèse n'améliore pas le phénotype ostéopérotique. Les souris *gl/gl* Trap-*Inpp4b*<sup>TG</sup> présentent une ostéopérose encore plus sévère que les souris *gl/gl* non-transgéniques. Ce phénotype ostéopérotique exacerbé est accompagné d'une diminution de l'ostéoclastogenèse *in vitro* et *in vivo*. La baisse d'expression d'*Inpp4b* dans les souris *gl* serait donc responsable de l'augmentation du nombre d'ostéoclastes, ce qui permettrait une compensation partielle du défaut de résorption (Figure 6-4).

En utilisant comme modèle de préostéoclastes les cellules RAW 264.7, nous avons montré qu'*Inpp4b*, en inhibant l'activation de la voie de NFATc1, était un régulateur négatif de l'ostéoclastogenèse. On pourrait donc penser que la sous-expression de ce gène dans les ostéoclastes *gl* entraînerait une activation plus importante de NFATc1, entraînant une augmentation de l'ostéoclastogenèse. Inversement, sa réexpression dans les souris *gl/gl* Trap-*Inpp4b*<sup>TG</sup> rétablirait un niveau d'activation normal, résultant en une réduction de la différenciation des ostéoclastes. L'étude de la voie NFATc1 dans les ostéoclastes *gl/gl* et *gl/gl* Trap-*Inpp4b*<sup>TG</sup> permettrait de vérifier cette hypothèse.

Il serait intéressant de générer une souris transgénique Trap-Inpp4b(C845A), surrexprimant le mutant phosphatase inactive dans les ostéoclastes *in vivo*. En se basant sur nos résultats obtenus *in vitro* dans les cellules RAW, nous pouvons penser qu'un tel transgène pourrait entraîner une augmentation de la différenciation des ostéoclastes, mais aussi affecter leur activité de résorption. Le phénotype que présenteraient les souris Trap-Inpp4b(C845A) est donc difficile à prédire.



**Figure 6-4. Modèles impliquant le niveau d'expression d'Inpp4b dans le contrôle de l'ostéoclastogenèse chez les souris +/+, *gl/gl* et *gl/gl* TRAP-Inpp4b<sup>Tg</sup>.**

Dans les souris sauvages (+/+) Inpp4b est un régulateur négatif de l'ostéoclastogenèse. Dans les souris *gl/gl*, Inpp4b est aussi un régulateur négatif, mais son expression est diminuée par un mécanisme inconnu (?). Cette diminution est associée à une augmentation du nombre d'ostéoclastes. Dans les souris *gl/gl* TRAP-Inpp4b<sup>Tg</sup> la réexpression d'Inpp4b via le transgène induit une réduction de l'ostéoclastogenèse et résulte en une masse osseuse augmentée.

Nos résultats soulèvent une autre question : par quel mécanisme l'expression du gène *Inpp4b* est-elle diminuée dans les ostéoclastes *gl/gl*? Fait intéressant, *Inpp4b* est sous-exprimée dans le tissu osseux *gl/gl*, mais également dans les ostéoclastes *gl/gl* en

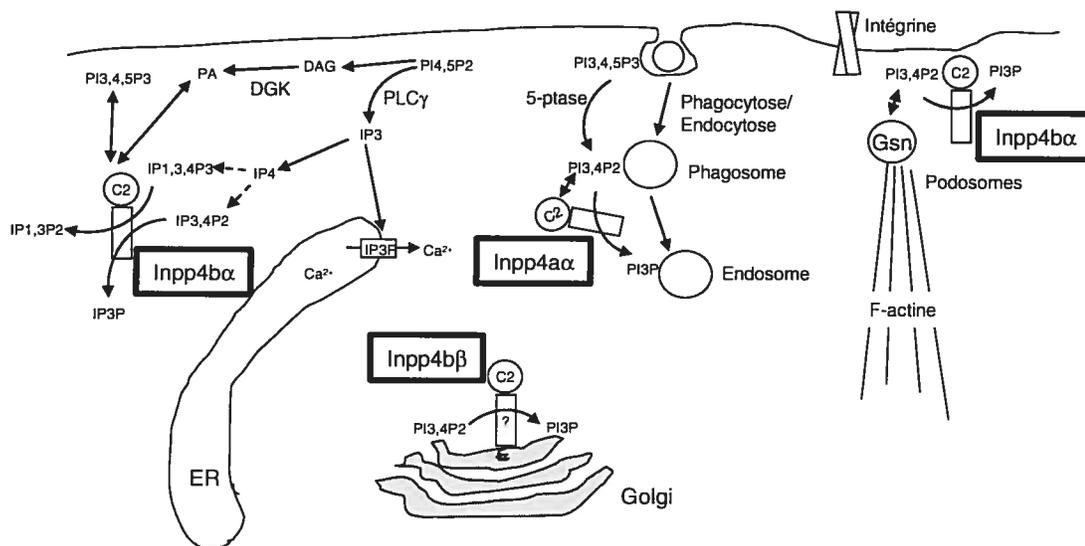
culture, ce qui suggère que le mécanisme responsable de la baisse d'expression de ce gène est intrinsèque aux ostéoclastes (« cell autonomous ») et ne dépend pas d'une boucle paracrine ou endocrine. Il demeure donc possible que l'expression d'*Inpp4b* soit plus ou moins directement contrôlée par la protéine *gl/Ostm1*. La fonction de *Ostm1* n'est pas encore déterminée, cependant des résultats préliminaires de notre laboratoire suggèrent qu'il s'agit d'une protéine transmembranaire glycosylée et localisée au réticulum endoplasmique. Bien sûr ces données ne permettent pas de conclure à une quelconque fonction pour *Ostm1*, mais je me permettrai à la lumière de ces informations de poser quelques hypothèses concernant le lien entre *Ostm1* et *Inpp4b*.

Je dois souligner qu'une étude de l'expression d'*Inpp4b* $\alpha$  et  $\beta$  dans les tissus *gl/gl* montre que ce gène est non seulement sous-exprimé dans l'os, mais aussi dans le rein, le muscle, le coeur et le testicule (voir annexe 2). Des cultures de mélanocytes nous ont également permis de montrer que *Inpp4b* $\alpha$  est exprimé dans les mélanocytes *+/+* et qu'une baisse de son expression est observée dans les mélanocytes *gl/gl* (voir annexe 2). Ces résultats suggèrent un lien épistatique entre *Inpp4b* et *gl* qui ne se limiterait pas aux ostéoclastes. Il serait donc possible que *Inpp4b* et *gl* fassent partie d'une voie moléculaire commune impliquée dans l'homéostasie de multiples tissus. Plusieurs observations appuient cette hypothèse : 1) le gène *gl* est exprimé de façon ubiquiste, il est donc probable que la protéine *Ostm1* joue un rôle dans plusieurs tissus; 2) la mutation *gl* est associée à au moins trois phénotypes distincts chez la souris, soit l'ostéopétrose due à un défaut des ostéoclastes, un transport de pigment anormal dans les mélanocytes et une dégénérescence neuronale. De plus, des indices expérimentaux indiquent que la souris *gl* présente aussi des phénotypes rénaux, intestinaux et au niveau du système hématopoïétique, ce qui suggère que la protéine *Ostm1* est impliquée dans des processus cellulaires communs à tous ces tissus; 3) *Inpp4b* est exprimée dans tous les tissus ou cellules où l'on observe un phénotype chez la souris *gl*, et *Inpp4b* est sous exprimée dans plusieurs tissus et cellules *gl/gl*, incluant les ostéoclastes et les mélanocytes.

Il reste donc à déterminer quelle est cette voie commune de signalisation qui inclut *Inpp4b* et *gl*. Mes résultats suggèrent qu'*Inpp4b* serait impliquée dans le contrôle de l'activation des facteurs transcription NFAT dans les ostéoclastes possiblement via le contrôle de la voie de l' $IP_3$  et du calcium. Les facteurs de la famille NFAT n'existent pas chez les invertébrés et sont impliqués dans l'homéostasie de plusieurs systèmes propres aux vertébrés incluant la masse osseuse, le système immunitaire, l'hypertrophie des muscles cardiaques et squelettiques, le système vasculaire et le système nerveux central (Horsley and Pavlath, 2002; Graef et al., 2001). Il est possible qu'*Osmt1* en tant que protéine transmembranaire et localisée au réticulum endoplasmique soit impliquée d'une quelconque façon dans le contrôle du calcium intracellulaire, ce qui pourrait expliquer le lien entre *gl* et *Inpp4b*. Des indices sur la fonction cellulaire d'*Ostm1* aideront à mieux définir ce lien.

#### 6.4. LOCALISATION ET EXPRESSION DIFFÉRENTIELLE DES ISOFORMES ALPHA ET BETA D'INPP4B

Nos résultats montrent que les isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  d'Inpp4b sont localisés de façon différentielle dans les cellules. Inpp4b $\alpha$  est une protéine cytoplasmique dans les cellules Cos et est recrutée au niveau des podosomes d'actine dans les ostéoclastes matures. Inpp4b $\beta$  est localisée principalement au niveau de l'appareil de Golgi dans les cellules Cos. De façon intéressante deux groupes ont montré récemment que Inpp4a $\alpha$  était quant à elle associée aux endosomes où elle jouait un rôle important dans la production de PI3P (Ivetac et al., 2005; Shin et al., 2005). Pour l'instant, aucune information sur la localisation d'Inpp4a $\beta$  n'est disponible. Cependant, la localisation différentielle des trois autres isoformes suggère des fonctions différentes dans la cellule (voir Figure 6-5).



**Figure 6-5. Modèle de la localisation cellulaire des divers isoformes des inositol polyphosphate 4-phosphatases a et b.**

Ce modèle est basé sur les résultats présentés dans cette thèse et les travaux de Ivetac *et al.* 2005 et de Shin *et al.* 2005. L'activité enzymatique des Inpp4 est indiquée par une flèche. L'interaction des domaines C2 avec certains phospholipides est indiquée par des flèches doubles. ER, réticulum endoplasmique; PA, acide phosphatidique; DAG, diacylglycérol; DGK, diacylglycérol kinase.

La localisation de l'isoforme Inpp4a $\alpha$  aux endosomes dépend de son domaine C2 qui lie le PI3,4P<sub>2</sub> (Ivetac et al., 2005). J'ai montré *in vitro*, dans un essai de liaison à des lipides immobilisés sur membrane, que le domaine C2 d'Inpp4b liait l'acide phosphatidique et le PI3,4,5P<sub>3</sub>. Il serait important de confirmer ce résultat en utilisant une autre technique, par exemple un essai de liaison aux liposomes (Fernandez et al., 2001). Quoiqu'il en soit nous pouvons tout de même proposer comme hypothèse que le recrutement d'Inpp4b $\alpha$  aux podosomes dans les ostéoclastes dépend de l'interaction du domaine C2 avec le PI3,4,5P<sub>3</sub> produit localement par la PI3 kinase. Il serait donc intéressant de générer des mutants du C2 incapables de lier le PI3,4,5P<sub>3</sub> et de vérifier si ces mutations affectent la localisation d'Inpp4b aux podosomes dans les OCL dérivés des cellules RAW. Il a déjà été montré pour d'autres domaines C2 que des résidus basiques étaient impliqués dans leur interaction avec les phospholipides (Dunn et al., 2004). On pourrait donc muter certains des résidus lysines présents dans les boucles du domaine C2 d'Inpp4b afin de déterminer leur importance dans la liaison au PI3,4,5P<sub>3</sub>. Les acides aminés K111, K118 et K121 semblent être de bons candidats (voir plus bas à propos de la liaison au calcium). D'autre part, une fusion C2-GFP permettrait de déterminer si ce domaine est suffisant pour permettre le recrutement à la membrane ou aux podosomes. Fait intéressant, l'acide phosphatidique (PA) est produit directement à partir du diacylglycérol (DAG) par la diacylglycérol kinase (DGK) (Luo et al., 2004). La liaison au PA via le domaine C2 d'Inpp4b est peut-être impliquée dans sa localisation au site de production de DAG et d'IP<sub>3</sub>, là où son activité enzymatique est requise (voir figure 6-5).

Plusieurs domaines C2 peuvent lier le calcium, et dans certains cas la liaison à un ou plusieurs ions Ca<sup>2+</sup> influence la liaison aux lipides (Chung et al., 1998). Dans les domaines C2 de topologie de type I (voir section 1.3.3.1.5.), la liaison au calcium requiert normalement la présence de résidus d'acide aspartique à des positions précises dans les boucles reliant les feuillettes beta 2 et 3 et 6 et 7, aussi appelées boucle 1 et 3 (Nalefski and Falke, 1996). D'après mes analyses bioinformatiques le domaine C2 d'Inpp4b présente une conformation de type I, similaire à celle du

domaine C2A de la synaptotagmine III (identité de 27%). L'alignement entre ces deux C2 révèle que les acides aspartiques en position 56, 116, 119 et 123 du C2 d'Inpp4b pourraient être impliqués dans la liaison de  $\text{Ca}^{2+}$  (voir annexe 9). Il serait donc important de vérifier si la liaison au calcium peut influencer la liaison aux phospholipides par le C2 d'Inpp4b. Des essais de liaisons en présence de calcium ou inversement en présence d'EDTA, permettrait de déterminer l'importance du calcium dans la liaison aux membranes. Finalement, la mutation de ces acides aspartiques devrait bloquer la liaison du C2 d'Inpp4b au calcium et peut-être aux phospholipides.

Le clonage du cDNA murin d'Inpp4b a permis l'identification d'un nouvel isoforme, Inpp4b $\alpha$ s. La particularité de cet isoforme est que 85 acides aminés en C-terminal y sont remplacés par 24 nouveaux acides aminés. Il en résulte que la moitié C-terminale du domaine C2 est modifiée dans Inpp4b $\alpha$ s. Il serait intéressant de vérifier si cette modification affecte la liaison d'Inpp4b $\alpha$ s au PA et au PI3,4,5P<sub>3</sub>. Mes résultats préliminaires suggèrent que la région N-terminale d'Inpp4b $\alpha$ s a une affinité légèrement différente pour les phosphoinositides (voir annexe 7). Si c'est le cas, il est possible que Inpp4b $\alpha$ s et Inpp4b $\alpha$  soit régulée de façon différente dans la cellule.

L'isoforme Inpp4b $\beta$  diffère d'Inpp4b $\alpha$  au niveau de sa région C-terminale (voir Figure 6-6). Cette région, hydrophile dans l'isoforme  $\alpha$ , est hydrophobe dans l'isoforme  $\beta$ . Ce domaine est potentiellement une hélice transmembranaire qui ancrerait l'isoforme  $\beta$  dans une membrane. Nos résultats montrent qu'Inpp4b $\beta$  est localisée au niveau de l'appareil de Golgi dans les cellules Cos. Il serait important de confirmer si Inpp4b $\beta$  endogène localise également au Golgi. Ceci serait d'autant plus intéressant que l'isoforme  $\beta$  présente une expression tissulaire très restreinte. Pour ce faire il faudrait générer un anticorps reconnaissant la partie unique à cet isoforme, c'est-à-dire la région C-terminale. Cette région de l'isoforme Inpp4b $\beta$  contient notamment une région unique de 30 acides aminés qui précède le domaine transmembranaire. Il est fort probable que le signal spécifiant la localisation

d'Inpp4b $\beta$  au Golgi est contenu dans ces 30 acides aminés. Une fusion entre cette région de la protéine et GFP pourrait être générée afin de vérifier si cette séquence est suffisante pour permettre le recrutement au Golgi. Des motifs di-acides DXE présents du côté cytoplasmique de certaines protéines transmembranaires ont été impliqués dans leur transfert du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi (Nishimura et al., 1999; Votsmeier and Gallwitz, 2001). De façon intéressante la séquence d'Inpp4b $\beta$  contient deux motifs di-acides palindromiques, formant la séquence EXDDXE (Figure 6-6). De plus, alors que les séquences C-terminales des isoformes Inpp4a $\alpha$  et Inpp4b $\alpha$  sont très bien conservées, les séquences protéiques des isoformes Inpp4a $\beta$  et Inpp4b $\beta$  sont peu conservées, particulièrement au niveau de la région des 30 acides aminés cytoplasmiques (Norris et al., 1997b). Par exemple, le motif EXDDXE n'est pas conservé chez Inpp4a $\beta$ . Il est possible que cette divergence de séquences soit responsable d'une localisation cellulaire unique pour les isoformes Inpp4a $\beta$  et Inpp4b $\beta$ . Des études de mutagenèse du motif EXDDXE devraient permettre de définir si cette séquence est responsable de la localisation d'Inpp4b $\beta$  au Golgi.

### Hydrophilic c-termini ( $\alpha$ -forms)

Type I ALECMRSEGCRRRENTMKNVGSRKYAFNSLQLKAFPKHYRPPEGTYGKVET  
 ||:||||.|||| ||.:||: |:|||| |||.|||| ||||| |||||. :|  
 Type II ALDCMRREGCRIENVLKNIKCRRYAFNMLQLMAFPKCYRPPEGTYGKADT

### Hydrophobic c-termini ( $\beta$ -forms)

Type I ALECMRSIGTREVVTQKNLSGLVPIRDLRLDPSLLCSIPLLALSPNLLIV  
 ||:|||||:|.:.: :.: :. .:| : . . : .: || :|.:||:|  
 Type II ALDCMRSRQTQOGALNESDDPETGCLSDNKPTSSRHFYPVALLLVSSHLLVV  
WLFLSIAYLVTKLRCK  
 ||. ||:|.|.:.|. .  
WLILSLALLLAKYQ

Figure 6-6. Alignement de la région C-terminale des isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  d'Inpp4a (Type I) et d'Inpp4b (Type II).

La région soulignée correspond à la séquence codée en amont de la jonction de l'épissage alternatif. La région encadrée dans la forme  $\beta$  indique le domaine transmembranaire potentiel. Deux motifs diacides présents uniquement dans Inpp4b $\beta$  sont soulignés. Les lignes verticales indiquent les acides aminés identiques. Les doubles points indiquent les substitutions conservatives (Norris F.A. et al. 1997b).

La localisation différentielle d'Inpp4b $\beta$  à l'appareil de Golgi soulève une question intéressante concernant la spécificité enzymatique de cet isoforme. En effet, Norris *et al.* ne sont pas parvenu à démontrer d'activité 4-phosphatase pour Inpp4b $\beta$  lorsqu'ils ont testé une protéine recombinante produite en bactérie ou dans des cellules d'insectes (Norris et al., 1997b). Cependant, lors de ces essais, ils n'ont testé qu'un seul substrat, le phosphatidylinositol 3,4-biphosphate (PI3,4P<sub>2</sub>). Trois raisons pourraient expliquer l'absence d'activité enzymatique d'Inpp4b $\beta$  *in vitro* : 1) Inpp4b $\beta$  requiert des cofacteurs *in vivo* afin d'être enzymatiquement active; 2) la modification de la séquence C-terminale dans Inpp4b $\beta$  modifie sa spécificité enzymatique; 3) Inpp4b $\beta$  est enzymatiquement inactive *in vivo*. La première et la troisième hypothèses sont difficiles à démontrer, sauf si l'on parvient à purifier l'enzyme sous forme de

complexe avec ses cofacteurs potentiels. D'autre part, Inpp4b $\alpha$  ne requiert aucun cofacteur *in vitro* afin d'être active. La deuxième hypothèse mériterait à mon avis d'être considérée, car il existe peu ou pas de PI3,4P<sub>2</sub> dans les membranes du Golgi, alors que d'autres PI phosphorylés en position 4' s'y retrouvent en concentration importante comme le PI4,5P<sub>2</sub> et le PI4P (Wang et al., 2003; Watt et al., 2002). Finalement, l'activité enzymatique d'Inpp4b $\beta$  envers les substrats solubles comme l'Ins1,3,4P<sub>3</sub> et l'Ins3,4P<sub>2</sub> mériterait d'être étudiée.

Nos études d'expression des 4 isoformes connues d'Inpp4 ont permis de montrer que ces enzymes étaient largement exprimées dans les tissus de souris. Les isoformes Inpp4a $\alpha$  et Inpp4b $\alpha$  sont exprimés dans la plupart des tissus. Par contre les isoformes Inpp4ba $\beta$  et Inpp4b $\beta$  présentent un patron d'expression plus restreint, suggérant un rôle spécifique en association avec des compartiments membranaires de certains tissus comme le cœur, le muscle squelettique et le cerveau.

Finalement, des recherches dans les banques de séquences nous ont permis d'identifier des orthologues d'Inpp4 chez la drosophile et chez *C. elegans*. Par contre, aucun orthologue ne semble exister chez les levures (*S. pombe* et *S. cerevisiae*). Bien que les PI3 kinases de classe I, II et III soient présentes chez tous les métazoaires, seul un gène codant pour une PI3 kinase de classe III, *vsp34*, a été identifié chez les levures (voir section 1.3.3.1.). Vsp34p peut synthétiser du PI3P, mais pas de PI3,4P<sub>2</sub> ou de PI3,4,5P<sub>3</sub>. Il semblait donc que la voie de synthèse de ses deux phosphoinositides n'existait pas chez les levures. Cependant, récemment un groupe a identifié et caractérisé un orthologue de *PTEN*, le gène *Ptn1*, chez *Schizosaccharomyces pombe* (Mitra et al., 2004). Ptn1p démontre une activité 3-phosphatase envers le PI3,4,5 P<sub>3</sub> similaire à son orthologue humain PTEN. De plus, dans une souche de levure déficiente en Ptn1p les niveaux de PI3,4P<sub>2</sub> et de PI3,4,5P<sub>3</sub> sont augmentés de 6 et 8 fois respectivement. Les résultats de cette étude suggèrent fortement que chez *S. pombe* le PI3,4,5P<sub>3</sub> est généré à partir du PI3,4P<sub>2</sub> par une phosphatidylinositol phosphate 5-kinase (PIP5K), Its3p, qui agit également comme

une phosphatidylinositol phosphate 4-kinase (PIP4K) et génère du PI3,4P<sub>2</sub> à partir du PI3P (voir section 1.3.3. et annexe 8). Donc, chez la levure en absence d'orthologue d'Inpp4 le PI3,4P<sub>2</sub> serait éliminé en étant converti en PI3,4,5P<sub>3</sub>, puis en PI4,5P<sub>2</sub> par Its3p et Ptn1p, respectivement (voir annexe 8). De même, il n'existe pas chez les levures d'orthologue caractérisé des phosphatases SHIP. Les données disponibles jusqu'à présent laissent donc croire que les PI3 kinases de classes I et II et les phosphatases Inpp4 et SHIP forment une voie de synthèse et de dégradation unique aux métazoaires.

## 6.5. LA SOURIS CD11B-CRE : UN OUTIL POUR L'ÉTUDE GÉNÉTIQUE DE L'OSTÉOCLASTOGENÈSE

Afin de pouvoir procéder à l'ablation conditionnelle du gène *Inpp4b* dans les ostéoclastes nous avons généré une souris exprimant la Cre recombinase dans les ostéoclastes et dans leurs précurseurs, un outil génétique qui n'existait pas au moment où nous avons commencé ce projet. Nous avons utilisé le promoteur humain du gène *CD11b*. Ce promoteur avait déjà été utilisé dans des études de transgénèses où il avait été démontré qu'il permettait une expression ciblée de transgènes dans les monocytes et les granulocytes (Dziennis et al., 1995). Deux lignées de souris CD11b-Cre que nous avons généré expriment la recombinase Cre de façon fonctionnelle dans les monocytes, les macrophages, les granulocytes et les ostéoclastes matures. Récemment deux autres lignées exprimant la recombinase Cre dans les ostéoclastes ont été décrites (Chiu et al., 2004). En utilisant les promoteurs des gènes *Trap* et *Ctsk* (cathepsine K), les auteurs de cette étude ont démontré une expression de la Cre dans les ostéoclastes matures. Puisque ces souris transgéniques ciblent une étape tardive de la différenciation, notre lignée de souris CD11b-Cre est essentielle afin d'étudier le rôle de gènes d'intérêt dans les préostéoclastes et au cours de l'ostéoclastogenèse précoce.

Cette lignée CD11b-Cre pourra être utilisée afin de déléter le gène *Inpp4b* spécifiquement dans les ostéoclastes et leurs précurseurs (voir section 6.6). La fonction de plusieurs gènes impliqués récemment dans l'ostéoclastogenèse pourra aussi être étudié grâce à cette lignée transgénique (voir tableau 6-1). La phosphatidylinositol phosphatase PTEN a été impliquée en tant que régulateur négatif dans la différenciation et l'activité des ostéoclastes dans des études utilisant les cellules RAW. Cependant, l'ablation du gène *Pten* chez la souris cause une mort embryonnaire précoce. Le croisement de souris *Pten<sup>flox/flox</sup>* par nos souris CD11b-Cre devrait permettre de déléter *Pten* uniquement dans les ostéoclastes et d'étudier le

phénotype squelettique en absence de ce gène. Une approche similaire pourra être utilisée afin d'étudier le rôle de NFATc1 dans l'ostéoclastogenèse *in vivo*. NFATc1 a en effet été impliqué par plusieurs études dans la différenciation des ostéoclastes, mais une preuve génétique de son rôle *in vivo* manque encore (Takayanagi et al., 2002a; Matsuo et al., 2004).

**Table 6-1. Exemple de gènes impliqués dans l'ostéoclastogenèse dont l'ablation cause des phénotypes de mort embryonnaire ou périnatale chez la souris.**

Gène	Protéine	Fonction dans les ostéoclastes	Phénotype des souris nulles	Allèle « floxé »	Références
<i>Akt1 et Akt2</i>	AKT1 et AKT2	Différenciation	Létal périnatal, défaut de prolifération	Non	(Peng et al., 2003)
<i>Erk2</i>	ERK2	Différenciation et survie	Létal embryonnaire, défaut de l'ectoderme extraembryonnaire	Non	(Saba-El-Leil et al., 2003)
<i>Nfatc1</i>	NFATc1	Différenciation	Létal embryonnaire, malformations cardiaques (E16.5)	Non	(Ranger et al., 1998) (de la Pompa et al., 1998)
<i>Pik3ca</i>	PI3K sous-unité catalytique p110 $\alpha$	Différenciation et activité	Létal embryonnaire, défaut de prolifération (E?)	Non	(Bi et al., 1999)
<i>Pik3r1</i>	PI3K sous-unité régulatrices p85 $\alpha$ , p55 $\alpha$ et p50 $\alpha$	Différenciation et activité	Létal périnatal, hypoglycémie, nécrose du foie	Non	(Fruman et al., 1999)
<i>Pten</i>	PTEN	Différenciation, survie et activité	Létal embryonnaire (E7.5).	Oui	(Suzuki et al., 1998)

## 6.6. FONCTION D'INPP4B IN VIVO : ABLATION GÉNIQUE CHEZ LA SOURIS

Afin de pouvoir étudier le rôle d'*Inpp4b* *in vivo* nous avons procédé à l'ablation de ce gène chez la souris. Nos travaux ont montré qu'*Inpp4b* est exprimé dans la plupart des tissus et que ce gène code pour au moins trois isoformes différents. Considérant cette expression relativement ubiquiste, il était possible que l'ablation générale de ce gène provoque une mortalité au cours du développement, empêchant l'étude d'éventuels phénotypes osseux. Afin d'éviter ce problème, nous avons donc choisi d'employer une approche d'ablation génique conditionnelle (« conditional knockout »). Plus précisément, j'ai choisi d'insérer deux sites *loxP* de part et d'autre de l'exon 11 d'*Inpp4b*. La délétion subséquente de l'exon 11 devait entraîner l'épissage entre l'exon 10 et 12 et l'apparition d'un codon non-sens (stop) prématuré en position de l'acide aminé 233 dans l'exon 12. Une telle mutation serait très similaire à la mutation *weeble* (Nystuen et al., 2001). De plus, la présence de ce codon non-sens à plus de 50 pb de la jonction entre l'exon 12 et l'exon 13, devrait provoquer la dégradation du messager par un mécanisme de NMD (non-sens mediated decay)(Maquat, 2004), comme dans la souris *weeble* où le messager *Inpp4a* est absent.

Nous avons généré trois allèles d'*Inpp4b* : l'allèle *neolox* (ou *n*), l'allèle *lox* et l'allèle  $\Delta 11$  (ou  $\Delta$ ) (voir chapitre 5). Les allèles *neo* et  $\Delta 11$  se comportent essentiellement comme des allèles nuls, puisque aucune protéine n'est détectée dans les tissus des souris homozygotes *Inpp4b<sup>nn</sup>* et *Inpp4b<sup>ΔΔ</sup>*. L'anticorps que j'ai développé contre *Inpp4b* reconnaît la partie N-terminale de la protéine (acides aminés 2-235) ce qui correspond à la région codée par les exons 3 à 12. Si une protéine tronquée avait été exprimée dans les souris homozygotes *Inpp4b<sup>nn</sup>* et *Inpp4b<sup>ΔΔ</sup>* nous l'aurions donc détectée, ce qui n'est pas le cas. On peut donc considérer que ces deux allèles empêchent complètement l'expression d'*Inpp4b*. Dans le cas de l'allèle  $\Delta 11$ , l'absence d'expression est probablement causée par un mécanisme de NMD, bien que

des études plus poussées au niveau de l'expression des ARNm d'*Inpp4b* dans les souris *Inpp4b*<sup>Δ/Δ</sup> doivent être complétés afin de le confirmer. D'après nos résultats, l'allèle *neo* affecte l'expression d'*Inpp4b* au niveau de l'ARN et de la protéine. Pour l'instant il nous est impossible de déterminer par quel mécanisme la présence de la cassette NEO dans l'intron 10 affecte ainsi l'expression du gène *Inpp4b*. Par contre, de nombreux allèles similaires ont été décrits dans la littérature (Ieraci et al., 2002; Voronina et al., 2005; Liu et al., 2004), et la présence d'une cassette NEO dans l'intron d'un gène peut en affecter la transcription (hypomorphe) ou résulter en des épissages aberrants.

Dans notre cas, l'allèle *lox* dans lequel la cassette NEO a été excisée exprime normalement *Inpp4b* au niveau protéique. Il s'agit donc d'un allèle conditionnel fonctionnel, puisque l'expression du gène *Inpp4b* n'est pas affectée et que la présence de sites *loxP* de part et d'autre de l'exon 11 permet de générer l'allèle  $\Delta$  en présence de la Cre recombinase.

Les croisements entre hétérozygotes *Inpp4b*<sup>+/ $\Delta$</sup>  a permis l'obtention de souris *Inpp4b*<sup>Δ/Δ</sup> viables. Ces souris ne présentent pas de défauts évidents, sont fertiles, présentent un poids comparable aux souris sauvages +/+ et vivent normalement jusqu'à au moins 6 mois. Fait intéressant, un certain pourcentage de souris homozygotes semble mourir avant le sevrage, c'est à dire *in utero* ou peu de temps après la naissance. De plus, ce pourcentage s'accroît à mesure que la pureté du fond génétique C57BL/6 s'accroît. Ainsi dans le croisement F4 x F4 (93% pur), seulement 16% d'homozygotes sont obtenus alors qu'une proportion de 25% est attendue. Cette observation suggère d'une part un effet néfaste de la perte d'*Inpp4b* sur le développement ou la survie des embryons ou des nouveau-nés, et d'autre part, une pénétrance incomplète de ce phénotype. Le fond génétique impur (7% 129SV, 93% C57BL/6) de notre croisement pourrait être responsable de la pénétrance incomplète. Il faudrait donc placer la mutation sur un fond génétique pur avant de déterminer à quel moment les embryons homozygotes meurent.

Une analyse du phénotype osseux chez les souris *Inpp4b<sup>ΔΔ</sup>* par micro-CT suggère une augmentation de la densité osseuse. Notre analyse montre chez les mâles une plus grande variabilité dans le groupe témoin que dans le groupe *Inpp4b<sup>ΔΔ</sup>*, ce qui pourrait être attribuable encore une fois à l'impureté du fond génétique. En effet, il existe déjà de grandes variations au niveau de la densité entre les différentes souches de souris (Beamer et al., 1996). Dans notre cas, le fond mélangé que nous avons utilisé pour nos études préliminaires (75 % de C57BL/6 et 25 % 129SV) peut expliquer une densité osseuse variable tant chez les souris contrôles que chez les souris déficientes en *Inpp4b*. En effet, d'après Beamer *et al.* la densité minérale au niveau du fémur est de 0.60 mg/mm<sup>3</sup> pour la souche 129/J et de 0.45 mg/mm<sup>3</sup> pour la souche C57BL/6. Quoiqu'il en soit, une analyse d'un plus grand nombre d'échantillons sur un fond génétique pur devrait permettre de confirmer ces observations.

La cause de l'augmentation de la densité osseuse chez les souris *Inpp4b<sup>ΔΔ</sup>* reste à déterminer. Je privilégie trois hypothèses pour l'instant : 1) la perte d'*Inpp4b* affecte négativement l'activité résorptive des ostéoclastes; 2) la perte d'*Inpp4b* résulte en une augmentation de l'ostéoclastogenèse et de la résorption et/ou a aussi un effet positif sur la différenciation des ostéoblastes et l'ostéogenèse; 3) le changement dans la masse osseuse n'est pas causé par un défaut intrinsèque aux cellules osseuses, mais plutôt par un effet neurologique ou endocrine. La première hypothèse est supportée par nos observations dans les cellules RAW où l'expression du mutant phosphatase-inactive d'*Inpp4b* bloque la formation de l'anneau d'actine et la résorption. La deuxième hypothèse est suggérée également par les expériences dans les cellules RAW où la surexpression d'*Inpp4b* réduit l'ostéoclastogenèse en affectant la voie de NFATc1. Deux observations additionnelles suggèrent qu'*Inpp4b* pourrait aussi être impliquée dans la différenciation des ostéoblastes. Premièrement, l'étude de l'expression des divers isoformes d'*Inpp4* dans les ostéoblastes montre que *Inpp4bα* est effectivement exprimée dans les ostéoblastes (voir annexe 3). Deuxièmement, une étude récente suggère que NFATc1 est également impliqué dans la différenciation et

dans l'activité des ostéoblastes (Koga et al., 2005). La perte d'Inpp4b pourrait donc résulter en une augmentation simultanée de la formation et de la résorption de la matrice osseuse, ce qui pourrait se manifester par une densité osseuse légèrement accrue si la formation est plus importante que la résorption. La troisième hypothèse est seulement supportée par le fait qu'Inpp4b est exprimée fortement au niveau du cerveau. Afin de confirmer l'une ou l'autre de ces hypothèses, des études *in vitro* du potentiel d'ostéoclastogenèse et d'ostéoblastogenèse des cellules *Inpp4b*<sup>ΔΔ</sup> devront être entreprises. Bien sûr, l'ablation conditionnelle d'Inpp4b dans les ostéoclastes grâce à la souris CD11b-Cre devrait grandement aider à répondre à cette question. En effet, si l'hypothèse 1) est vraie, l'ablation d'Inpp4b uniquement dans les ostéoclastes devrait causer un phénotype identique aux souris *Inpp4b*<sup>ΔΔ</sup>. Par contre si c'est l'hypothèse 2) qui est vraie, cette ablation génique conditionnelle devrait résulter en une perte de masse osseuse. Aucun phénotype osseux ne devrait être observé si l'hypothèse 3) est vraie.

Outre ce phénotype osseux, qui reste à être confirmé, les souris *Inpp4b*<sup>ΔΔ</sup> qui survivent jusqu'au moment du sevrage ne présentent aucun phénotype apparent. Ce résultat est surprenant si on considère l'expression relativement ubiquiste d'Inpp4b. Cependant, nos travaux ont également montré qu'Inpp4a était aussi exprimée dans la plupart des tissus. Il est donc possible que la perte d'Inpp4b soit compensée par Inpp4a. La seule façon de le démontrer sera de générer des doubles mutant *Inpp4b*<sup>ΔΔ</sup> *wbl/wbl* dans lesquels les deux gènes, *Inpp4a* et *Inpp4b*, seront absents. Si Inpp4a et Inpp4b assurent des fonctions non redondantes dans le développement, ces doubles mutants devraient présenter le phénotype *weeble*, c'est-à-dire une dégénérescence neuronale et une mort postnatale entre 2 et 4 semaines. Par contre, si ces protéines présentent une certaine redondance, des phénotypes additionnels devraient être observés dans le double mutant. Nos données et celles de Ivetac *et al.* montrent cependant qu'au niveau cellulaire les protéines Inpp4aα et Inpp4bα ont une localisation et une fonction différente, suggérant que leurs rôles physiologiques respectifs ne sont pas redondants.

## 6.7. INPP4B UN MODULATEUR GÉNÉTIQUE DE L'HOMÉOSTASIE OSSEUSE?

L'ensemble des travaux présentés dans cette thèse suggère un rôle génétique pour *Inpp4b* dans le contrôle de l'homéostasie osseuse. D'abord, *Inpp4b* inhibe la différenciation des ostéoclastes *in vitro*. Ensuite, la réexpression d'*Inpp4b* dans les ostéoclastes *gl/gl* par transgénèse affecte la masse osseuse de ces souris. Finalement, l'ablation du gène *Inpp4b* chez la souris semble causer un phénotype de masse osseuse accrue. Fait intéressant, le phénotype osseux des souris *Inpp4b<sup>ΔΔ</sup>* ne semble pas pathologique puisqu'elles ne souffrent pas d'ostéopétrose ou d'ostéosclérose et qu'elles présentent une taille et un poids comparable aux souris contrôles. De plus, des études préliminaires suggèrent une augmentation non seulement de l'os trabéculaire, mais également de l'os cortical chez les souris déficientes en *Inpp4b*, ce qui, normalement, représente un effet positif pour la résistance des os. Des analyses biomécaniques permettant de mesurer la résistance des os *Inpp4b<sup>ΔΔ</sup>* devront être effectuées afin de confirmer cet effet.

Si l'on considère qu'un changement dans l'activité ou dans l'expression d'*Inpp4b* dans les ostéoclastes peut moduler leur activité et ainsi affecter la masse osseuse, on peut aussi considérer comme probable que des variants dans ce gène puissent être impliqués dans des variations de la masse osseuse entre les individus au sein d'une population saine. J'ai donc décidé de vérifier si des études avaient permis d'identifier des loci de traits quantitatifs osseux (QTL : « quantitative trait loci ») dans la région chromosomique comprenant le gène *Inpp4b* chez la souris (chr 8), le rat (chr 19) ou l'humain (Chr 4). Le tableau 6-2 présentent les différents QTL de densité osseuse associés à des régions chromosomiques incluant le locus *Inpp4b* chez ces trois mammifères.

**Table 6-2. Recensement des QTL osseux associés au locus d'Inpp4b chez les mammifères.**

Species	Parameters	Samples	Chromosome	Marker or position	Physical or genetic dist. from Inpp4b	Reference
Mouse	Tibia % mineral	C57BL/6 x DBA/2	8	40-57 cM	Inpp4b included in the interval	(Lang et al., 2005)
Mouse	Female vertebral trabecular density (BV/TV, TbN, TbTh)	C57BL/6J x C3H/HeJ	8	D8Mit 75	< 1 Mb	(Bouxsein et al., 2004)
Mouse	Femoral cross-sectional area (FCSA)	C57BL/6 x DBA/2	8	D8Mit 45	~5 Mb	(Klein et al., 2002)
Mouse	Femur-breaking strength (FBS)	MRL x SJL	8	D8Mit125	~25 Mb	(Li et al., 2002a)
Mouse	Male and female whole body bone mineral density (WB-BMD)	C57BL/6 x DBA/2	8	D8Ncvs46	~3 cM	(Orwoll et al., 2001)
Rat	L <sub>5</sub> vertebrae strength and BMD	Fischer 344 x Lewis	19	D19Rat32	~15 Mb	(Alam et al., 2005)
Human	Femoral neck BMD (FN-BMD)	Healthy people	4q	D4S406	< 1 Mb	(Ralston et al., 2005)
Human	Spine BMD Wrist BMD	Healthy people	4q	D4S424 D4S413	~2 Mb ~14 Mb	(Deng et al., 2002)
Human	Spine and hip BMD	Family having recurrence of low BMD	4q	D4S1539	~20 Mb	(Devoto et al., 1998)

En tout, 9 QTL sont associés au gène *Inpp4b* : 6 chez la souris, 1 chez le rat et 3 chez l'humain (Tableau 6-2). Dans certains cas, les marqueurs polymorphiques associés au QTL sont assez éloignés d'*Inpp4b* (>20 Mb). Par contre dans d'autres cas les marqueurs associés aux traits osseux sont situés très près du locus d'*Inpp4b* (Bouxsein et al., 2004; Ralston et al., 2005; Deng et al., 2002).

Plus spécifiquement, Bouxsein *et al.*, dans une étude de la densité osseuse trabéculaire des vertèbres lombaires dans un « intercross » F2{(C57BL/6 x C3H)X(C57BL/6 x C3H)}, montre un lien entre le marqueur D8Mit75 et la densité trabéculaire (BV, BV/TV, TbTh et TbN) de la cinquième vertèbre lombaire (L5) chez les femelles. Une analyse de la localisation génétique de ce marqueur m'a permis de déterminer qu'il se trouvait à environ 35 cM du centromère du chromosome 8 de la souris, ce qui colocalise génétiquement avec *Inpp4b*. Au niveau physique, la séquence du marqueur D8Mit75 se trouve dans le gène *Il15* à un peu moins de 400 kb en 3' du gène *Inpp4b*. Le « LOD score » de ce QTL est parmi les plus élevés de cette étude (12.9 pour le BV/TV) ce qui suggère une forte association avec le marqueur D8Mit75.

D'autres gènes dans la région de ce marqueur pourraient influencer la masse osseuse. *Il15* par exemple, codent pour l'interleukine 15 qui a été impliqué comme un régulateur positif de la différenciation des ostéoclastes *in vitro* (Ogata et al., 1999). Cependant, considérant l'augmentation de la densité osseuse observée chez les souris *Inpp4b*<sup>ΔΔ</sup>, *Inpp4b* nous est apparu comme un bon candidat pour ce QTL. J'ai donc décidé de vérifier si la séquence codante d'*Inpp4b* dans les souches C57BL/6 (B6) et C3H/HeJ (C3) présentait des variations qui pourraient être associées à ce QTL. Au niveau de la séquence en nucléotides 11 variations sur un total de 2781 nucléotides ont été détectées entre C3H et B6 et de celles-ci seulement 4 modifient la séquence polypeptidique d'*Inpp4b* (voir annexe 4). L'une de ces variations se trouve en C-

terminale du domaine C2 (137:B6leu/C3pro). Les trois autres variations se retrouvent dans une région de seulement 87 acides aminés au centre de la protéine (491:B6ser/C3arg; 566:B6his/C3pro; 576:B6pro/C3ser). En examinant plus attentivement cette partie de la protéine, j'ai pu déterminer qu'elle contenait deux séquences consensus PEST qui sont définies comme des séquences d'au moins 12 acides aminés riche en proline, acide aspartique ou glutamique, sérine et thréonine et flanquée d'acides aminés basiques (arginine, lysine ou histidine). Aucun acide aminé basique ne doit se trouver à l'intérieur de la séquence (Rechsteiner and Rogers, 1996). Ainsi, la présence de l'arginine en position 491 chez C3H invalide la prédiction de la première séquence PEST. Inversement, la présence d'une histidine en position 566 dans B6 invalide la deuxième séquence PEST (voir annexe 4).

Les séquences PEST sont impliquées dans l'instabilité de plusieurs protéines comme Fos, IκB et p27<sup>Kip</sup> (Hirano et al., 2004; Rechsteiner and Rogers, 1996). Le mécanisme par lequel ces séquences sont impliquées dans la dégradation protéique n'est pas clairement défini, mais impliquerait dans certains cas la voie de l'ubiquitination et du protéasome, et d'en d'autres cas une protéolyse directe par la calpaïne (Spencer et al., 2004; Marie et al., 2005). Dans le dernier cas, il n'est pas non plus déterminé si les séquences PEST sont des sites consensus de protéolyse par la calpaïne ou si elles sont plutôt impliquées dans des interactions protéine-protéine qui participent au recrutement de la calpaïne (Tompa et al., 2004).

Il a été montré que Inpp4a était soumise à une protéolyse par la calpaïne dans les plaquettes humaines suite à la stimulation par la thrombine (Norris et al., 1997a). De façon intéressante, ce clivage affecte négativement l'activité 4-phosphatase de la protéine, indiquant qu'il s'agit d'un mécanisme de contrôle négatif. D'après mes analyses, Inpp4a contient également des séquences PEST dans sa partie centrale (annexe 4). Il est donc possible que les deux polymorphismes présents au niveau des séquences PEST d'Inpp4b chez C57BL/6 et CH3/HeJ affectent directement la stabilité de la protéine. Une différence dans la stabilité et conséquemment de

l'activité d'Inpp4b pourrait donc être partiellement responsable de la différence de densité osseuse entre ces deux souches de souris. Des études plus poussées sur la stabilité des variants C3H et B6 d'Inpp4b devront être effectuées afin de vérifier cette hypothèse.

## 6.8. CONCLUSION

J'ai présenté dans cette thèse des résultats qui impliquent pour la première fois l'inositol polyphosphate 4-phosphatase de type II (Inpp4b) dans la différenciation des ostéoclastes et dans leur fonction résorptive. D'une part, Inpp4b serait un régulateur négatif de la voie d'activation du facteur de transcription NFATc1 lors de l'ostéoclastogenèse. D'autre part, cette phosphatase serait aussi impliquée dans la dynamique de formation des podosomes, de l'anneau d'actine et de la résorption dans les ostéoclastes matures. Mes travaux m'ont également amené à mieux caractériser le gène murin *Inpp4b*, un gène qui possède une régulation complexe et qui est exprimé sous plusieurs isoformes. Finalement, j'ai pu générer des outils qui permettront l'étude *in vivo* de la fonction d'Inpp4b, incluant des allèles nul et conditionnel d'Inpp4b, de même qu'une souris CD11b-Cre qui exprime la recombinaison Cre spécifiquement dans les ostéoclastes et leurs précurseurs. Mes résultats suggèrent un rôle pour Inpp4b dans l'homéostasie osseuse et en font un candidat très intéressant en tant que gène participant à la variabilité de la masse osseuse chez les mammifères, en particulier chez l'humain.

## RÉFÉRENCES

- Abu-Amer, Y., Dowdy, S.F., Ross, F.P., Clohisy, J.C., and Teitelbaum, S.L. (2001). TAT fusion proteins containing tyrosine 42-deleted  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  arrest osteoclastogenesis. *J. Biol. Chem.* 276, 30499-30503.
- Abu-Amer, Y., Ross, F.P., Schlesinger, P., Tondravi, M.M., and Teitelbaum, S.L. (1997). Substrate recognition by osteoclast precursors induces C-src/microtubule association. *J. Cell Biol.* 137, 247-258.
- Alam, I., Sun, Q., Liu, L., Koller, D.L., Fishburn, T., Carr, L.G., Econs, M.J., Foroud, T., and Turner, C.H. (2005). Whole-genome scan for linkage to bone strength and structure in inbred Fischer 344 and lewis rats. *J. Bone Miner. Res.* 20, 1589-1596.
- Alessi, D.R., Deak, M., Casamayor, A., Caudwell, F.B., Morrice, N., Norman, D.G., Gaffney, P., Reese, C.B., MacDougall, C.N., Harbison, D., Ashworth, A., and Bownes, M. (1997). 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Curr. Biol.* 7, 776-789.
- Alliston, T., Choy, L., Ducy, P., Karsenty, G., and Derynck, R. (2001). TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *EMBO J.* 20, 2254-2272.
- Aman, M.J., Lamkin, T.D., Okada, H., Kurosaki, T., and Ravichandran, K.S. (1998). The inositol phosphatase SHIP inhibits Akt/PKB activation in B cells. *J. Biol. Chem.* 273, 33922-33928.
- 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.
- Arcaro, A., Volinia, S., Zvelebil, M.J., Stein, R., Watton, S.J., Layton, M.J., Gout, I., Ahmadi, K., Downward, J., and Waterfield, M.D. (1998). Human phosphoinositide 3-kinase C2beta, the role of calcium and the C2 domain in enzyme activity. *J. Biol. Chem.* 273, 33082-33090.
- Arcaro, A., Zvelebil, M.J., Wallasch, C., Ullrich, A., Waterfield, M.D., and Domin, J. (2000). Class II phosphoinositide 3-kinases are downstream targets of activated polypeptide growth factor receptors. *Mol. Cell Biol.* 20, 3817-3830.

Armstrong,A.P., Tometsko,M.E., Glaccum,M., Sutherland,C.L., Cosman,D., and Dougall,W.C. (2002). A RANK/TRAF6-dependent signal transduction pathway is essential for osteoclast cytoskeletal organization and resorptive function. *J. Biol. Chem.* 277, 44347-44356.

Attree,O., Olivos,I.M., Okabe,I., Bailey,L.C., Nelson,D.L., Lewis,R.A., McInnes,R.R., and Nussbaum,R.L. (1992). The Lowe's oculocerebrorenal syndrome gene encodes a protein highly homologous to inositol polyphosphate-5-phosphatase. *Nature* 358, 239-242.

Aubin,J.E. (1992). Osteoclast adhesion and resorption: the role of podosomes. *J. Bone Miner. Res.* 7, 365-368.

Azuma,Y., Kaji,K., Katogi,R., Takeshita,S., and Kudo,A. (2000). Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *J. Biol. Chem.* 275, 4858-4864.

Balemans,W. and Van Hul,W. (2002). Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. *Dev. Biol.* 250, 231-250.

Balla,T., Downing,G.J., Jaffe,H., Kim,S., Zolyomi,A., and Catt,K.J. (1997). Isolation and molecular cloning of wortmannin-sensitive bovine type III phosphatidylinositol 4-kinases. *J. Biol. Chem.* 272, 18358-18366.

Bansal,V.S., Caldwell,K.K., and Majerus,P.W. (1990). The isolation and characterization of inositol polyphosphate 4-phosphatase. *J. Biol. Chem.* 265, 1806-1811.

Barylko,B., Gerber,S.H., Binns,D.D., Grichine,N., Khvotchev,M., Sudhof,T.C., and Albanesi,J.P. (2001). A novel family of phosphatidylinositol 4-kinases conserved from yeast to humans. *J. Biol. Chem.* 276, 7705-7708.

Battaglino,R., Kim,D., Fu,J., Vaage,B., Fu,X.Y., and Stashenko,P. (2002). c-myc is required for osteoclast differentiation. *J. Bone Miner. Res.* 17, 763-773.

Bazenet,C.E., Ruano,A.R., Brockman,J.L., and Anderson,R.A. (1990). The human erythrocyte contains two forms of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase which are differentially active toward membranes. *J. Biol. Chem.* 265, 18012-18022.

Beamer,W.G., Donahue,L.R., Rosen,C.J., and Baylink,D.J. (1996). Genetic variability in adult bone density among inbred strains of mice. *Bone* 18, 397-403.

Beeton,C.A., Das,P., Waterfield,M.D., and Shepherd,P.R. (1999). The SH3 and BH domains of the p85alpha adapter subunit play a critical role in regulating class Ia phosphoinositide 3-kinase function. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* 1, 153-157.

Bi,L., Okabe,I., Bernard,D.J., and Nussbaum,R.L. (2002). Early embryonic lethality in mice deficient in the p110beta catalytic subunit of PI 3-kinase. *Mamm. Genome* 13, 169-172.

Bi,L., Okabe,I., Bernard,D.J., Wynshaw-Boris,A., and Nussbaum,R.L. (1999). Proliferative defect and embryonic lethality in mice homozygous for a deletion in the p110alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 274, 10963-10968.

Bialek,P., Kern,B., Yang,X., Schrock,M., Sasic,D., Hong,N., Wu,H., Yu,K., Ornitz,D.M., Olson,E.N., Justice,M.J., and Karsenty,G. (2004). A twist code determines the onset of osteoblast differentiation. *Dev. Cell* 6, 423-435.

Biswas,R.S., Baker,D., Hruska,K.A., and Chellaiah,M.A. (2004). Polyphosphoinositides-dependent regulation of the osteoclast actin cytoskeleton and bone resorption. *BMC. Cell Biol.* 5, 19.

Boronenkov,I.V. and Anderson,R.A. (1995). The sequence of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase defines a novel family of lipid kinases. *J. Biol. Chem.* 270, 2881-2884.

Bouxsein,M.L., Uchiyama,T., Rosen,C.J., Shultz,K.L., Donahue,L.R., Turner,C.H., Sen,S., Churchill,G.A., Muller,R., and Beamer,W.G. (2004). Mapping quantitative trait loci for vertebral trabecular bone volume fraction and microarchitecture in mice. *J. Bone Miner. Res.* 19, 587-599.

Boyce,B.F., Yoneda,T., Lowe,C., Soriano,P., and Mundy,G.R. (1992). Requirement of pp60c-src expression for osteoclasts to form ruffled borders and resorb bone in mice. *J. Clin. Invest* 90, 1622-1627.

Boyle,W.J., Simonet,W.S., and Lacey,D.L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423, 337-342.

Brown,E.J. and Baltimore,D. (2003). Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance. *Genes Dev.* 17, 615-628.

Brown,R.A., Domin,J., Arcaro,A., Waterfield,M.D., and Shepherd,P.R. (1999). Insulin activates the alpha isoform of class II phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 274, 14529-14532.

Bueno,O.F., Brandt,E.B., Rothenberg,M.E., and Molkentin,J.D. (2002). Defective T cell development and function in calcineurin A beta -deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 9398-9403.

Burd,C.G. and Emr,S.D. (1998). Phosphatidylinositol(3)-phosphate signaling mediated by specific binding to RING FYVE domains. *Mol. Cell* 2, 157-162.

Cano,E., Hazzalin,C.A., Kardalidou,E., Buckle,R.S., and Mahadevan,L.C. (1995). Neither ERK nor JNK/SAPK MAP kinase subtypes are essential for histone H3/HMG-14 phosphorylation or c-fos and c-jun induction. *J. Cell Sci.* *108 ( Pt 11)*, 3599-3609.

Cantley,L.C. and Neel,B.G. (1999). New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 4240-4245.

Capdevila,J. and Izpisua Belmonte,J.C. (2001). Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *17*, 87-132.

Cecchini,M.G., Dominguez,M.G., Mocci,S., Wetterwald,A., Felix,R., Fleisch,H., Chisholm,O., Hofstetter,W., Pollard,J.W., and Stanley,E.R. (1994). Role of colony stimulating factor-1 in the establishment and regulation of tissue macrophages during postnatal development of the mouse. *Development* *120*, 1357-1372.

Cerwenka,A. and Lanier,L.L. (2001). Ligands for natural killer cell receptors: redundancy or specificity. *Immunol. Rev.* *181*, 158-169.

Chaisson,M.L., Branstetter,D.G., Derry,J.M., Armstrong,A.P., Tometsko,M.E., Takeda,K., Akira,S., and Dougall,W.C. (2004). Osteoclast differentiation is impaired in the absence of inhibitor of kappa B kinase alpha. *J. Biol. Chem.* *279*, 54841-54848.

Chalhoub,N., Benachenhou,N., Rajapurohitam,V., Pata,M., Ferron,M., Frattini,A., Villa,A., and Vacher,J. (2003). Grey-lethal mutation induces severe malignant autosomal recessive osteopetrosis in mouse and human. *Nat. Med.* *9*, 399-406.

Chalhoub,N., Benachenhou,N., and Vacher,J. (2001). Physical and transcriptional map of the mouse Chromosome 10 proximal region syntenic to human 6q16-q21. *Mamm. Genome* *12*, 887-892.

Chambers,T.J. (2000). Regulation of the differentiation and function of osteoclasts. *J. Pathol.* *192*, 4-13.

Chan,V.S., Wong,C., and Ohashi,P.S. (2002). Calcineurin Aalpha plays an exclusive role in TCR signaling in mature but not in immature T cells. *Eur. J. Immunol.* *32*, 1223-1229.

Chantry,D., Vojtek,A., Kashishian,A., Holtzman,D.A., Wood,C., Gray,P.W., Cooper,J.A., and Hoekstra,M.F. (1997). p110delta, a novel phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit that associates with p85 and is expressed predominantly in leukocytes. *J. Biol. Chem.* *272*, 19236-19241.

- Cheever,M.L., Sato,T.K., de Beer,T., Kutateladze,T.G., Emr,S.D., and Overduin,M. (2001). Phox domain interaction with PtdIns(3)P targets the Vam7 t-SNARE to vacuole membranes. *Nat. Cell Biol.* 3, 613-618.
- Chellaiah,M., Fitzgerald,C., Alvarez,U., and Hruska,K. (1998). c-Src is required for stimulation of gelsolin-associated phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 11908-11916.
- Chellaiah,M. and Hruska,K. (1996). Osteopontin stimulates gelsolin-associated phosphoinositide levels and phosphatidylinositol triphosphate-hydroxyl kinase. *Mol. Biol. Cell* 7, 743-753.
- Chellaiah,M.A. (2005). Regulation of actin ring formation by Rho GTPases in osteoclasts. *J. Biol. Chem.*
- Chen,H., Rossier,C., Morris,M.A., Scott,H.S., Gos,A., Bairoch,A., and Antonarakis,S.E. (1999). A testis-specific gene, TPTE, encodes a putative transmembrane tyrosine phosphatase and maps to the pericentromeric region of human chromosomes 21 and 13, and to chromosomes 15, 22, and Y. *Hum. Genet.* 105, 399-409.
- Chiu,W.S., McManus,J.F., Notini,A.J., Cassady,A.I., Zajac,J.D., and Davey,R.A. (2004). Transgenic mice that express Cre recombinase in osteoclasts. *Genesis.* 39, 178-185.
- Chiusaroli,R., Sanjay,A., Henriksen,K., Engsig,M.T., Horne,W.C., Gu,H., and Baron,R. (2003). Deletion of the gene encoding c-Cbl alters the ability of osteoclasts to migrate, delaying resorption and ossification of cartilage during the development of long bones. *Dev. Biol.* 261, 537-547.
- Chung,S.H., Song,W.J., Kim,K., Bednarski,J.J., Chen,J., Prestwich,G.D., and Holz,R.W. (1998). The C2 domains of Rabphilin3A specifically bind phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate containing vesicles in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner. In vitro characteristics and possible significance. *J. Biol. Chem.* 273, 10240-10248.
- Ciruela,A., Hinchliffe,K.A., Divecha,N., and Irvine,R.F. (2000). Nuclear targeting of the beta isoform of type II phosphatidylinositol phosphate kinase (phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase) by its alpha-helix 7. *Biochem. J.* 346 Pt 3, 587-591.
- Clement,S., Krause,U., Desmedt,F., Tanti,J.F., Behrends,J., Pesesse,X., Sasaki,T., Penninger,J., Doherty,M., Malaisse,W., Dumont,J.E., Marchand-Brustel,Y., Erneux,C., Hue,L., and Schurmans,S. (2001). The lipid phosphatase SHIP2 controls insulin sensitivity. *Nature* 409, 92-97.

Coppolino, M.G., Dierckman, R., Loijens, J., Collins, R.F., Pouladi, M., Jongstra-Bilen, J., Schreiber, A.D., Trimble, W.S., Anderson, R., and Grinstein, S. (2002). Inhibition of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase I $\alpha$  impairs localized actin remodeling and suppresses phagocytosis. *J. Biol. Chem.* 277, 43849-43857.

Cote, J.F., Motoyama, A.B., Bush, J.A., and Vuori, K. (2005). A novel and evolutionarily conserved PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>-binding domain is necessary for DOCK180 signalling. *Nat. Cell Biol.* 7, 797-807.

Crackower, M.A., Oudit, G.Y., Koziarzki, I., Sarao, R., Sun, H., Sasaki, T., Hirsch, E., Suzuki, A., Shioi, T., Irie-Sasaki, J., Sah, R., Cheng, H.Y., Rybin, V.O., Lembo, G., Fratta, L., Oliveira-dos-Santos, A.J., Benovic, J.L., Kahn, C.R., Izumo, S., Steinberg, S.F., Wymann, M.P., Backx, P.H., and Penninger, J.M. (2002). Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell* 110, 737-749.

Cremona, O. and De Camilli, P. (2001). Phosphoinositides in membrane traffic at the synapse. *J. Cell Sci.* 114, 1041-1052.

Cremona, O., Di Paolo, G., Wenk, M.R., Luthi, A., Kim, W.T., Takei, K., Daniell, L., Nemoto, Y., Shears, S.B., Flavell, R.A., McCormick, D.A., and De Camilli, P. (1999). Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell* 99, 179-188.

Cundy, T., Hegde, M., Naot, D., Chong, B., King, A., Wallace, R., Mulley, J., Love, D.R., Seidel, J., Fawcner, 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.

Dai, S., Hirayama, T., Abbas, S., and Abu-Amer, Y. (2004). The I $\kappa$ B kinase (IKK) inhibitor, NEMO-binding domain peptide, blocks osteoclastogenesis and bone erosion in inflammatory arthritis. *J. Biol. Chem.* 279, 37219-37222.

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.

Damen, J.E., Liu, L., Rosten, P., Humphries, R.K., Jefferson, A.B., Majerus, P.W., and Krystal, G. (1996). The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetrakisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate 5-phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 1689-1693.

Datta,S.R., Brunet,A., and Greenberg,M.E. (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* *13*, 2905-2927.

David,J.P., Sabapathy,K., Hoffmann,O., Idarraga,M.H., and Wagner,E.F. (2002). JNK1 modulates osteoclastogenesis through both c-Jun phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J. Cell Sci.* *115*, 4317-4325.

Day,T.F., Guo,X., Garrett-Beal,L., and Yang,Y. (2005). Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev. Cell* *8*, 739-750.

de la Pompa,J.L., Timmerman,L.A., Takimoto,H., Yoshida,H., Elia,A.J., Samper,E., Potter,J., Wakeham,A., Marengere,L., Langille,B.L., Crabtree,G.R., and Mak,T.W. (1998). Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. *Nature* *392*, 182-186.

De Matteis,M.A. and Godi,A. (2004). PI-loting membrane traffic. *Nat. Cell Biol.* *6*, 487-492.

Deng,C., Wynshaw-Boris,A., Zhou,F., Kuo,A., and Leder,P. (1996). Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* *84*, 911-921.

Deng,H.W., Xu,F.H., Huang,Q.Y., Shen,H., Deng,H., Conway,T., Liu,Y.J., Liu,Y.Z., Li,J.L., Zhang,H.T., Davies,K.M., and Recker,R.R. (2002). A whole-genome linkage scan suggests several genomic regions potentially containing quantitative trait Loci for osteoporosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab* *87*, 5151-5159.

Destaing,O., Saltel,F., Geminard,J.C., Jurdic,P., and Bard,F. (2003). Podosomes display actin turnover and dynamic self-organization in osteoclasts expressing actin-green fluorescent protein. *Mol. Biol. Cell* *14*, 407-416.

Devoto,M., Shimoya,K., Caminis,J., Ott,J., Tenenhouse,A., Whyte,M.P., Sereda,L., Hall,S., Considine,E., Williams,C.J., Tromp,G., Kuivaniemi,H., Ala-Kokko,L., Prockop,D.J., and Spotila,L.D. (1998). First-stage autosomal genome screen in extended pedigrees suggests genes predisposing to low bone mineral density on chromosomes 1p, 2p and 4q. *Eur. J. Hum. Genet.* *6*, 151-157.

Di Cristofano,A., Pesce,B., Cordon-Cardo,C., and Pandolfi,P.P. (1998). Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat. Genet.* *19*, 348-355.

Dodds,R.A., James,I.E., Rieman,D., Ahern,R., Hwang,S.M., Connor,J.R., Thompson,S.D., Veber,D.F., Drake,F.H., Holmes,S., Lark,M.W., and Gowen,M. (2001). Human osteoclast cathepsin K is processed intracellularly prior to attachment and bone resorption. *J. Bone Miner. Res.* *16*, 478-486.

Domin, J., Gaidarov, I., Smith, M.E., Keen, J.H., and Waterfield, M.D. (2000). The class II phosphoinositide 3-kinase PI3K-C2alpha is concentrated in the trans-Golgi network and present in clathrin-coated vesicles. *J. Biol. Chem.* 275, 11943-11950.

Domin, J., Pages, F., Volinia, S., Rittenhouse, S.E., Zvelebil, M.J., Stein, R.C., and Waterfield, M.D. (1997). Cloning of a human phosphoinositide 3-kinase with a C2 domain that displays reduced sensitivity to the inhibitor wortmannin. *Biochem. J.* 326 (Pt 1), 139-147.

Donald, S., Hill, K., Lecureuil, C., Barnouin, R., Krugmann, S., John, C.W., Andrews, S.R., Walker, S.A., Hawkins, P.T., Stephens, L.R., and Welch, H.C. (2004). P-Rex2, a new guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *FEBS Lett.* 572, 172-176.

Dove, S.K., McEwen, R.K., Mayes, A., Hughes, D.C., Beggs, J.D., and Michell, R.H. (2002). Vac14 controls PtdIns(3,5)P(2) synthesis and Fab1-dependent protein trafficking to the multivesicular body. *Curr. Biol.* 12, 885-893.

Dowler, S., Currie, R.A., Campbell, D.G., Deak, M., Kular, G., Downes, C.P., and Alessi, D.R. (2000). Identification of pleckstrin-homology-domain-containing proteins with novel phosphoinositide-binding specificities. *Biochem. J.* 351, 19-31.

Ducy, P., Amling, M., Takeda, S., Priemel, M., Schilling, A.F., Beil, F.T., Shen, J., Vinson, C., Rueger, J.M., and Karsenty, G. (2000). Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* 100, 197-207.

Ducy, P., Desbois, C., Boyce, B., Pinero, G., Story, B., Dunstan, C., Smith, E., Bonadio, J., Goldstein, S., Gundberg, C., Bradley, A., and Karsenty, G. (1996). Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382, 448-452.

Ducy, P. and Karsenty, G. (1995). Two distinct osteoblast-specific cis-acting elements control expression of a mouse osteocalcin gene. *Mol. Cell Biol.* 15, 1858-1869.

Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L., and Karsenty, G. (1997). *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89, 747-754.

Dunn, R., Klos, D.A., Adler, A.S., and Hicke, L. (2004). The C2 domain of the Rsp5 ubiquitin ligase binds membrane phosphoinositides and directs ubiquitination of endosomal cargo. *J. Cell Biol.* 165, 135-144.

Duong, L.T., Lakkakorpi, P.T., Nakamura, I., Machwate, M., Nagy, R.M., and Rodan, G.A. (1998). PYK2 in osteoclasts is an adhesion kinase, localized in the sealing zone, activated by ligation of alpha(v)beta3 integrin, and phosphorylated by src kinase. *J. Clin. Invest* 102, 881-892.

- Duong,L.T., Nakamura,I., Lakkakorpi,P.T., Lipfert,L., Bett,A.J., and Rodan,G.A. (2001). Inhibition of osteoclast function by adenovirus expressing antisense protein-tyrosine kinase 2. *J. Biol. Chem.* 276, 7484-7492.
- Duran,A., Serrano,M., Leitges,M., Flores,J.M., Picard,S., Brown,J.P., Moscat,J., and Diaz-Meco,M.T. (2004). The atypical PKC-interacting protein p62 is an important mediator of RANK-activated osteoclastogenesis. *Dev. Cell* 6, 303-309.
- Dziennis,S., Van Etten,R.A., Pahl,H.L., Morris,D.L., Rothstein,T.L., Blosch,C.M., Perlmutter,R.M., and Tenen,D.G. (1995). The CD11b promoter directs high-level expression of reporter genes in macrophages in transgenic mice. *Blood* 85, 319-329.
- Eapen,M., Davies,S.M., Ramsay,N.K., and Orchard,P.J. (1998). Hematopoietic stem cell transplantation for infantile osteopetrosis. *Bone Marrow Transplant.* 22, 941-946.
- Eferl,R., Hoebertz,A., Schilling,A.F., Rath,M., Karreth,F., Kenner,L., Amling,M., and Wagner,E.F. (2004). The Fos-related antigen Fra-1 is an activator of bone matrix formation. *EMBO J.* 23, 2789-2799.
- Eleftheriou,F., Ahn,J.D., Takeda,S., Starbuck,M., Yang,X., Liu,X., Kondo,H., Richards,W.G., Bannon,T.W., Noda,M., Clement,K., Vaisse,C., and Karsenty,G. (2005). Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature* 434, 514-520.
- Ellson,C.D., Gobert-Gosse,S., Anderson,K.E., Davidson,K., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., Thuring,J.W., Cooper,M.A., Lim,Z.Y., Holmes,A.B., Gaffney,P.R., Coadwell,J., Chilvers,E.R., Hawkins,P.T., and Stephens,L.R. (2001). PtdIns(3)P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40(phox). *Nat. Cell Biol.* 3, 679-682.
- Elmqvist,J.K., Ahima,R.S., Elias,C.F., Flier,J.S., and Saper,C.B. (1998). Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 741-746.
- Engleman,V.W., Nickols,G.A., Ross,F.P., Horton,M.A., Griggs,D.W., Settle,S.L., Ruminski,P.G., and Teitelbaum,S.L. (1997). A peptidomimetic antagonist of the alpha(v)beta3 integrin inhibits bone resorption in vitro and prevents osteoporosis in vivo. *J. Clin. Invest* 99, 2284-2292.
- Faccio,R., Takeshita,S., Zallone,A., Ross,F.P., and Teitelbaum,S.L. (2003). c-Fms and the alphavbeta3 integrin collaborate during osteoclast differentiation. *J. Clin. Invest* 111, 749-758.
- Faccio,R., Teitelbaum,S.L., Fujikawa,K., Chappel,J., Zallone,A., Tybulewicz,V.L., Ross,F.P., and Swat,W. (2005). Vav3 regulates osteoclast function and bone mass. *Nat. Med.* 11, 284-290.

Farley,F.W., Soriano,P., Steffen,L.S., and Dymecki,S.M. (2000). Widespread recombinase expression using FLPeR (flipper) mice. *Genesis*. 28, 106-110.

Feldmann,M. (2001). Pathogenesis of arthritis: recent research progress. *Nat. Immunol.* 2, 771-773.

Felson,D.T. (1993). The course of osteoarthritis and factors that affect it. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 19, 607-615.

Feng,X., Takeshita,S., Namba,N., Wei,S., Teitelbaum,S.L., and Ross,F.P. (2002). Tyrosines 559 and 807 in the cytoplasmic tail of the macrophage colony-stimulating factor receptor play distinct roles in osteoclast differentiation and function. *Endocrinology* 143, 4868-4874.

Fernandez,I., Arac,D., Ubach,J., Gerber,S.H., Shin,O., Gao,Y., Anderson,R.G., Sudhof,T.C., and Rizo,J. (2001). Three-dimensional structure of the synaptotagmin 1 C2B-domain: synaptotagmin 1 as a phospholipid binding machine. *Neuron* 32, 1057-1069.

Fleischmann,A., Hafezi,F., Elliott,C., Reme,C.E., Ruther,U., and Wagner,E.F. (2000). Fra-1 replaces c-Fos-dependent functions in mice. *Genes Dev.* 14, 2695-2700.

Ford,M.G., Pearse,B.M., Higgins,M.K., Vallis,Y., Owen,D.J., Gibson,A., Hopkins,C.R., Evans,P.R., and McMahon,H.T. (2001). Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P2 and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes. *Science* 291, 1051-1055.

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.

Fruman,D.A., Cantley,L.C., and Carpenter,C.L. (1996). Structural organization and alternative splicing of the murine phosphoinositide 3-kinase p85 alpha gene. *Genomics* 37, 113-121.

Fruman,D.A., Mauvais-Jarvis,F., Pollard,D.A., Yballe,C.M., Brazil,D., Bronson,R.T., Kahn,C.R., and Cantley,L.C. (2000). Hypoglycaemia, liver necrosis and perinatal death in mice lacking all isoforms of phosphoinositide 3-kinase p85 alpha. *Nat. Genet.* 26, 379-382.

Fruman,D.A., Meyers,R.E., and Cantley,L.C. (1998). Phosphoinositide kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 481-507.

Fruman,D.A., Snapper,S.B., Yballe,C.M., Davidson,L., Yu,J.Y., Alt,F.W., and Cantley,L.C. (1999). Impaired B cell development and proliferation in absence of phosphoinositide 3-kinase p85alpha. *Science* 283, 393-397.

Fujikawa,Y., Sabokbar,A., Neale,S.D., Itonaga,I., Torisu,T., and Athanasou,N.A. (2001). The effect of macrophage-colony stimulating factor and other humoral factors (interleukin-1, -3, -6, and -11, tumor necrosis factor-alpha, and granulocyte macrophage-colony stimulating factor) on human osteoclast formation from circulating cells. *Bone* 28, 261-267.

Gaidarov,I., Smith,M.E., Domin,J., and Keen,J.H. (2001). The class II phosphoinositide 3-kinase C2alpha is activated by clathrin and regulates clathrin-mediated membrane trafficking. *Mol. Cell* 7, 443-449.

Galibert,L., Tometsko,M.E., Anderson,D.M., Cosman,D., and Dougall,W.C. (1998). The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors in the signaling mechanisms of receptor activator of NF-kappaB, a member of the TNFR superfamily. *J. Biol. Chem.* 273, 34120-34127.

Gattei,V., Aldinucci,D., Quinn,J.M., Degan,M., Cozzi,M., Perin,V., Iulii,A.D., Juzbasic,S., Improta,S., Athanasou,N.A., Ashman,L.K., and Pinto,A. (1996). Human osteoclasts and preosteoclast cells (FLG 29.1) express functional c-kit receptors and interact with osteoblast and stromal cells via membrane-bound stem cell factor. *Cell Growth Differ.* 7, 753-763.

Gaullier,J.M., Simonsen,A., D'Arrigo,A., Bremnes,B., Stenmark,H., and Aasland,R. (1998). FYVE fingers bind PtdIns(3)P. *Nature* 394, 432-433.

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.

Gilbert,S.F. (2000). *Developmental Biology*.

Gillooly,D.J., Morrow,I.C., Lindsay,M., Gould,R., Bryant,N.J., Gaullier,J.M., Parton,R.G., and Stenmark,H. (2000). Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *EMBO J.* 19, 4577-4588.

Gillooly,D.J., Simonsen,A., and Stenmark,H. (2001). Cellular functions of phosphatidylinositol 3-phosphate and FYVE domain proteins. *Biochem. J.* 355, 249-258.

Gingery,A., Bradley,E., Shaw,A., and Oursler,M.J. (2003). Phosphatidylinositol 3-kinase coordinately activates the MEK/ERK and AKT/NFkappaB pathways to maintain osteoclast survival. *J. Cell Biochem.* 89, 165-179.

Glantschnig,H., Fisher,J.E., Wesolowski,G., Rodan,G.A., and Reszka,A.A. (2003). M-CSF, TNF $\alpha$  and RANK ligand promote osteoclast survival by signaling through mTOR/S6 kinase. *Cell Death. Differ.* *10*, 1165-1177.

Glass,D.A., Bialek,P., Ahn,J.D., Starbuck,M., Patel,M.S., Clevers,H., Taketo,M.M., Long,F., McMahan,A.P., Lang,R.A., and Karsenty,G. (2005). Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev. Cell* *8*, 751-764.

Godi,A., Pertile,P., Meyers,R., Marra,P., Di Tullio,G., Iurisci,C., Luini,A., Corda,D., and De Matteis,M.A. (1999). ARF mediates recruitment of PtdIns-4-OH kinase-beta and stimulates synthesis of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> on the Golgi complex. *Nat. Cell Biol.* *1*, 280-287.

Gohda,J., Akiyama,T., Koga,T., Takayanagi,H., Tanaka,S., and Inoue,J. (2005). RANK-mediated amplification of TRAF6 signaling leads to NFATc1 induction during osteoclastogenesis. *EMBO J.* *24*, 790-799.

Golden,L.H. and Insogna,K.L. (2004). The expanding role of PI3-kinase in bone. *Bone* *34*, 3-12.

Graef,I.A., Chen,F., and Crabtree,G.R. (2001). NFAT signaling in vertebrate development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *11*, 505-512.

Grano,M., Galimi,F., Zamboni,G., Colucci,S., Cottone,E., Zallone,A.Z., and Comoglio,P.M. (1996). Hepatocyte growth factor is a coupling factor for osteoclasts and osteoblasts in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 7644-7648.

Grey,A., Chen,Y., Paliwal,I., Carlberg,K., and Insogna,K. (2000). Evidence for a functional association between phosphatidylinositol 3-kinase and c-src in the spreading response of osteoclasts to colony-stimulating factor-1. *Endocrinology* *141*, 2129-2138.

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.

Gruneberg, H. A new sub-lethal colour mutation in the house mouse. *Proc R Soc Lond (Biol)* *118*, 321-342. 1935.

Ref Type: Generic

Gu,J., Tamura,M., Pankov,R., Danen,E.H., Takino,T., Matsumoto,K., and Yamada,K.M. (1999). Shc and FAK differentially regulate cell motility and directionality modulated by PTEN. *J. Cell Biol.* *146*, 389-403.

Guo,S., Stolz,L.E., Lemrow,S.M., and York,J.D. (1999). SAC1-like domains of yeast SAC1, INP52, and INP53 and of human synaptojanin encode polyphosphoinositide phosphatases. *J. Biol. Chem.* 274, 12990-12995.

Gurung,R., Tan,A., Ooms,L.M., McGrath,M.J., Huysmans,R.D., Munday,A.D., Prescott,M., Whisstock,J.C., and Mitchell,C.A. (2003). Identification of a novel domain in two mammalian inositol-polyphosphate 5-phosphatases that mediates membrane ruffle localization. The inositol 5-phosphatase skip localizes to the endoplasmic reticulum and translocates to membrane ruffles following epidermal growth factor stimulation. *J. Biol. Chem.* 278, 11376-11385.

Haffner,C., Takei,K., Chen,H., Ringstad,N., Hudson,A., Butler,M.H., Salcini,A.E., Di Fiore,P.P., and De Camilli,P. (1997). Synaptojanin 1: localization on coated endocytic intermediates in nerve terminals and interaction of its 170 kDa isoform with Eps15. *FEBS Lett.* 419, 175-180.

Han,J., Luby-Phelps,K., Das,B., Shu,X., Xia,Y., Mosteller,R.D., Krishna,U.M., Falck,J.R., White,M.A., and Broek,D. (1998). Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science* 279, 558-560.

Harlan,J.E., Hajduk,P.J., Yoon,H.S., and Fesik,S.W. (1994). Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* 371, 168-170.

Haslam,R.J., Koide,H.B., and Hemmings,B.A. (1993). Pleckstrin domain homology. *Nature* 363, 309-310.

Haslam,S.I., Van Hul,W., Morales-Piga,A., Balemans,W., San Millan,J.L., Nakatsuka,K., Willems,P., Haites,N.E., and Ralston,S.H. (1998). Paget's disease of bone: evidence for a susceptibility locus on chromosome 18q and for genetic heterogeneity. *J. Bone Miner. Res.* 13, 911-917.

Helgason,C.D., Damen,J.E., Rosten,P., Grewal,R., Sorensen,P., Chappel,S.M., Borowski,A., Jirik,F., Krystal,G., and Humphries,R.K. (1998). Targeted disruption of SHIP leads to hemopoietic perturbations, lung pathology, and a shortened life span. *Genes Dev.* 12, 1610-1620.

Hill,T.P., Spater,D., Taketo,M.M., Birchmeier,W., and Hartmann,C. (2005). Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev. Cell* 8, 727-738.

Hilpela,P., Vartiainen,M.K., and Lappalainen,P. (2004). Regulation of the actin cytoskeleton by PI(4,5)P2 and PI(3,4,5)P3. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 282, 117-163.

Hirano,K., Ihara,E., Hirano,M., Nishimura,J., Nawata,H., and Kanaide,H. (2004). Facilitation of proteasomal degradation of p27Kip1 by N-terminal cleavage and their sequence requirements. *FEBS Lett.* 574, 111-115.

Hiroaki,H., Ago,T., Ito,T., Sumimoto,H., and Kohda,D. (2001). Solution structure of the PX domain, a target of the SH3 domain. *Nat. Struct. Biol.* 8, 526-530.

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.

Hofbauer,L.C., Khosla,S., Dunstan,C.R., Lacey,D.L., Boyle,W.J., and Riggs,B.L. (2000). The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J. Bone Miner. Res.* 15, 2-12.

Hofbauer,L.C. and Schoppet,M. (2002). Osteoprotegerin gene polymorphism and the risk of osteoporosis and vascular disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 87, 4078-4079.

Honda,A., Nogami,M., Yokozeki,T., Yamazaki,M., Nakamura,H., Watanabe,H., Kawamoto,K., Nakayama,K., Morris,A.J., Frohman,M.A., and Kanaho,Y. (1999). Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell* 99, 521-532.

Horsley,V. and Pavlath,G.K. (2002). NFAT: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation. *J. Cell Biol.* 156, 771-774.

Hu,H., Hilton,M.J., Tu,X., Yu,K., Ornitz,D.M., and Long,F. (2005). Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development* 132, 49-60.

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.

Hurley,J.H. and Misra,S. (2000). Signaling and subcellular targeting by membrane-binding domains. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 49-79.

Husson,H., Mograbi,B., Schmid-Antomarchi,H., Fischer,S., and Rossi,B. (1997). CSF-1 stimulation induces the formation of a multiprotein complex including CSF-1 receptor, c-Cbl, PI 3-kinase, Crk-II and Grb2. *Oncogene* 14, 2331-2338.

Hyman,J., Chen,H., Di Fiore,P.P., De Camilli,P., and Brunger,A.T. (2000). Epsin 1 undergoes nucleocytoplasmic shuttling and its eps15 interactor NH(2)-terminal homology (ENTH) domain, structurally similar to Armadillo and HEAT repeats,

interacts with the transcription factor promyelocytic leukemia Zn(2)+ finger protein (PLZF). *J. Cell Biol.* *149*, 537-546.

Hyvonen,M., Macias,M.J., Nilges,M., Oschkinat,H., Saraste,M., and Wilmanns,M. (1995). Structure of the binding site for inositol phosphates in a PH domain. *EMBO J.* *14*, 4676-4685.

Idris,A.I., 't Hof,R.J., Greig,I.R., Ridge,S.A., Baker,D., Ross,R.A., and Ralston,S.H. (2005). Regulation of bone mass, bone loss and osteoclast activity by cannabinoid receptors. *Nat. Med.* *11*, 774-779.

Ieraci,A., Forni,P.E., and Ponzetto,C. (2002). Viable hypomorphic signaling mutant of the Met receptor reveals a role for hepatocyte growth factor in postnatal cerebellar development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 15200-15205.

Ikeda,F., Nishimura,R., Matsubara,T., Tanaka,S., Inoue,J., Reddy,S.V., Hata,K., Yamashita,K., Hiraga,T., Watanabe,T., Kukita,T., Yoshioka,K., Rao,A., and Yoneda,T. (2004). Critical roles of c-Jun signaling in regulation of NFAT family and RANKL-regulated osteoclast differentiation. *J. Clin. Invest* *114*, 475-484.

Ikonomov,O.C., Sbrissa,D., Mlak,K., Kanzaki,M., Pessin,J., and Shisheva,A. (2002). Functional dissection of lipid and protein kinase signals of PIKfyve reveals the role of PtdIns 3,5-P2 production for endomembrane integrity. *J. Biol. Chem.* *277*, 9206-9211.

Ingham,P.W., Nystedt,S., Nakano,Y., Brown,W., Stark,D., van den,H.M., and Taylor,A.M. (2000). Patched represses the Hedgehog signalling pathway by promoting modification of the Smoothed protein. *Curr. Biol.* *10*, 1315-1318.

Insogna,K.L., Sahni,M., Grey,A.B., Tanaka,S., Horne,W.C., Neff,L., Mitnick,M., Levy,J.B., and Baron,R. (1997). Colony-stimulating factor-1 induces cytoskeletal reorganization and c-src-dependent tyrosine phosphorylation of selected cellular proteins in rodent osteoclasts. *J. Clin. Invest* *100*, 2476-2485.

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.

Ishihara,H., Shibasaki,Y., Kizuki,N., Katagiri,H., Yazaki,Y., Asano,T., and Oka,Y. (1996). Cloning of cDNAs encoding two isoforms of 68-kDa type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *J. Biol. Chem.* *271*, 23611-23614.

Ito,Y. and Miyazono,K. (2003). RUNX transcription factors as key targets of TGF-beta superfamily signaling. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *13*, 43-47.

Itoh,T., Ijuin,T., and Takenawa,T. (1998). A novel phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase (phosphatidylinositol-phosphate kinase IIgamma) is phosphorylated in the endoplasmic reticulum in response to mitogenic signals. *J. Biol. Chem.* *273*, 20292-20299.

Itoh,T., Koshiba,S., Kigawa,T., Kikuchi,A., Yokoyama,S., and Takenawa,T. (2001). Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis. *Science* *291*, 1047-1051.

Ivetac,I., Munday,A.D., Kisseleva,M.V., Zhang,X.M., Luff,S., Tiganis,T., Whisstock,J.C., Rowe,T., Majerus,P.W., and Mitchell,C.A. (2005). The type Ialpha inositol polyphosphate 4-phosphatase generates and terminates phosphoinositide 3-kinase signals on endosomes and the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell* *16*, 2218-2233.

Janetopoulos,C., Borleis,J., Vazquez,F., Iijima,M., and Devreotes,P. (2005). Temporal and spatial regulation of phosphoinositide signaling mediates cytokinesis. *Dev. Cell* *8*, 467-477.

Janmey,P.A. and Lindberg,U. (2004). Cytoskeletal regulation: rich in lipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 658-666.

Janne,P.A., Suchy,S.F., Bernard,D., MacDonald,M., Crawley,J., Grinberg,A., Wynshaw-Boris,A., Westphal,H., and Nussbaum,R.L. (1998). Functional overlap between murine *Inpp5b* and *Ocrl1* may explain why deficiency of the murine ortholog for *OCRL1* does not cause Lowe syndrome in mice. *J. Clin. Invest* *101*, 2042-2053.

Janssens,K., de Vernejoul,M.C., de Freitas,F., Vanhoenacker,F., and Van Hul,W. (2005). An intermediate form of juvenile Paget's disease caused by a truncating *TNFRSF11B* mutation. *Bone* *36*, 542-548.

Jimi,E., Akiyama,S., Tsurukai,T., Okahashi,N., Kobayashi,K., Udagawa,N., Nishihara,T., Takahashi,N., and Suda,T. (1999). Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function. *J. Immunol.* *163*, 434-442.

Jimi,E., Nakamura,I., Ikebe,T., Akiyama,S., Takahashi,N., and Suda,T. (1998). Activation of NF-kappaB is involved in the survival of osteoclasts promoted by interleukin-1. *J. Biol. Chem.* *273*, 8799-8805.

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.

Kanai,F., Liu,H., Field,S.J., Akbary,H., Matsuo,T., Brown,G.E., Cantley,L.C., and Yaffe,M.B. (2001). The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K. *Nat. Cell Biol.* 3, 675-678.

Kanazawa,K. and Kudo,A. (2005). TRAF2 is essential for TNF-alpha-induced osteoclastogenesis. *J. Bone Miner. Res.* 20, 840-847.

Kanzler,B., Kuschert,S.J., Liu,Y.H., and Mallo,M. (1998). Hoxa-2 restricts the chondrogenic domain and inhibits bone formation during development of the branchial area. *Development* 125, 2587-2597.

Karsenty,G. and Wagner,E.F. (2002). Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev. Cell* 2, 389-406.

Kashiwada,M., Shirakata,Y., Inoue,J.I., Nakano,H., Okazaki,K., Okumura,K., Yamamoto,T., Nagaoka,H., and Takemori,T. (1998). Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) stimulates extracellular signal-regulated kinase (ERK) activity in CD40 signaling along a ras-independent pathway. *J. Exp. Med.* 187, 237-244.

Katso,R., Okkenhaug,K., Ahmadi,K., White,S., Timms,J., and Waterfield,M.D. (2001). Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 615-675.

Kay,B.K., Yamabhai,M., Wendland,B., and Emr,S.D. (1999). Identification of a novel domain shared by putative components of the endocytic and cytoskeletal machinery. *Protein Sci.* 8, 435-438.

Kenner,L., Hoebertz,A., Beil,T., Keon,N., Karreth,F., Eferl,R., Scheuch,H., Szremaska,A., Amling,M., Schorpp-Kistner,M., Angel,P., and Wagner,E.F. (2004). Mice lacking JunB are osteopenic due to cell-autonomous osteoblast and osteoclast defects. *J. Cell Biol.* 164, 613-623.

Kern,B., Shen,J., Starbuck,M., and Karsenty,G. (2001). Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes. *J. Biol. Chem.* 276, 7101-7107.

Kim,H.H., Chung,W.J., Lee,S.W., Chung,P.J., You,J.W., Kwon,H.J., Tanaka,S., and Lee,Z.H. (2003). Association of sustained ERK activity with integrin beta3 induction during receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)-directed osteoclast differentiation. *Exp. Cell Res.* 289, 368-377.

Kim,H.H., Lee,D.E., Shin,J.N., Lee,Y.S., Jeon,Y.M., Chung,C.H., Ni,J., Kwon,B.S., and Lee,Z.H. (1999). Receptor activator of NF-kappaB recruits multiple TRAF family adaptors and activates c-Jun N-terminal kinase. *FEBS Lett.* 443, 297-302.

Kishida,S., Sanjo,H., Akira,S., Matsumoto,K., and Ninomiya-Tsuji,J. (2005). TAK1-binding protein 2 facilitates ubiquitination of TRAF6 and assembly of TRAF6 with IKK in the IL-1 signaling pathway. *Genes Cells* 10, 447-454.

Kivens,W.J., Hunt,S.W., III, Mobley,J.L., Zell,T., Dell,C.L., Bierer,B.E., and Shimizu,Y. (1998). Identification of a proline-rich sequence in the CD2 cytoplasmic domain critical for regulation of integrin-mediated adhesion and activation of phosphoinositide 3-kinase. *Mol. Cell Biol.* 18, 5291-5307.

Klein,R.F., Turner,R.J., Skinner,L.D., Vartanian,K.A., Serang,M., Carlos,A.S., Shea,M., Belknap,J.K., and Orwoll,E.S. (2002). Mapping quantitative trait loci that influence femoral cross-sectional area in mice. *J. Bone Miner. Res.* 17, 1752-1760.

Klein-Nulend,J., Nijweide,P.J., and Burger,E.H. (2003). Osteocyte and bone structure. *Curr. Osteoporos. Rep.* 1, 5-10.

Kobayashi,N., Kadono,Y., Naito,A., Matsumoto,K., Yamamoto,T., Tanaka,S., and Inoue,J. (2001). Segregation of TRAF6-mediated signaling pathways clarifies its role in osteoclastogenesis. *EMBO J.* 20, 1271-1280.

Koga,T., Inui,M., Inoue,K., Kim,S., Suematsu,A., Kobayashi,E., Iwata,T., Ohnishi,H., Matozaki,T., Kodama,T., Taniguchi,T., Takayanagi,H., and Takai,T. (2004). Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature* 428, 758-763.

Koga,T., Matsui,Y., Asagiri,M., Kodama,T., de Crombrughe,B., Nakashima,K., and Takayanagi,H. (2005). NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nat. Med.* 11, 880-885.

Komarova,S.V., Pilkington,M.F., Weidema,A.F., Dixon,S.J., and Sims,S.M. (2003). RANK ligand-induced elevation of cytosolic Ca<sup>2+</sup> accelerates nuclear translocation of nuclear factor kappa B in osteoclasts. *J. Biol. Chem.* 278, 8286-8293.

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.

Kong,A.M., Speed,C.J., O'Malley,C.J., Layton,M.J., Meehan,T., Loveland,K.L., Cheema,S., Ooms,L.M., and Mitchell,C.A. (2000). Cloning and characterization of a 72-kDa inositol-polyphosphate 5-phosphatase localized to the Golgi network. *J. Biol. Chem.* 275, 24052-24064.

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.

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 ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell* 104, 205-215.

Kornak,U., Schulz,A., Friedrich,W., Uhlhaas,S., Kremens,B., Voit,T., Hasan,C., Bode,U., Jentsch,T.J., and Kubisch,C. (2000). Mutations in the  $\alpha 3$  subunit of the vacuolar H(+)-ATPase cause infantile malignant osteopetrosis. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2059-2063.

Krugmann,S., Hawkins,P.T., Pryer,N., and Braselmann,S. (1999). Characterizing the interactions between the two subunits of the p101/p110gamma phosphoinositide 3-kinase and their role in the activation of this enzyme by G beta gamma subunits. *J. Biol. Chem.* 274, 17152-17158.

Kutateladze,T.G., Ogburn,K.D., Watson,W.T., de Beer,T., Emr,S.D., Burd,C.G., and Overduin,M. (1999). Phosphatidylinositol 3-phosphate recognition by the FYVE domain. *Mol. Cell* 3, 805-811.

Kutateladze,T.G. and Overduin,M. (2000). Sequence-specific  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  resonance assignments of the EEA1 FYVE domain. *J. Biomol. NMR* 17, 89-90.

Kwon,C.H., Zhu,X., Zhang,J., Knoop,L.L., Tharp,R., Smeyne,R.J., Eberhart,C.G., Burger,P.C., and Baker,S.J. (2001). Pten regulates neuronal soma size: a mouse model of Lhermitte-Duclos disease. *Nat. Genet.* 29, 404-411.

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.

Lam,J., Takeshita,S., Barker,J.E., Kanagawa,O., Ross,F.P., and Teitelbaum,S.L. (2000). TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *J. Clin. Invest* 106, 1481-1488.

Lamkin,T.D., Walk,S.F., Liu,L., Damen,J.E., Krystal,G., and Ravichandran,K.S. (1997). Shc interaction with Src homology 2 domain containing inositol phosphatase (SHIP) in vivo requires the Shc-phosphotyrosine binding domain and two specific phosphotyrosines on SHIP. *J. Biol. Chem.* 272, 10396-10401.

Lang,D.H., Sharkey,N.A., Mack,H.A., Vogler,G.P., Vandenberg,D.J., Blizard,D.A., Stout,J.T., and McClearn,G.E. (2005). Quantitative trait loci analysis of structural and

material skeletal phenotypes in C57BL/6J and DBA/2 second-generation and recombinant inbred mice. *J. Bone Miner. Res.* *20*, 88-99.

Lark, M.W., Stroup, G.B., James, I.E., Dodds, R.A., Hwang, S.M., Blake, S.M., Lechowska, B.A., Hoffman, S.J., Smith, B.R., Kapadia, R., Liang, X., Erhard, K., Ru, Y., Dong, X., Marquis, R.W., Veber, D., and Gowen, M. (2002). A potent small molecule, nonpeptide inhibitor of cathepsin K (SB 331750) prevents bone matrix resorption in the ovariectomized rat. *Bone* *30*, 746-753.

Laurin, N., Brown, J.P., Morissette, J., and Raymond, V. (2002). Recurrent mutation of the gene encoding sequestosome 1 (SQSTM1/p62) in Paget disease of bone. *Am. J. Hum. Genet.* *70*, 1582-1588.

Laxminarayan, K.M., Chan, B.K., Tetaz, T., Bird, P.I., and Mitchell, C.A. (1994). Characterization of a cDNA encoding the 43-kDa membrane-associated inositol-polyphosphate 5-phosphatase. *J. Biol. Chem.* *269*, 17305-17310.

Lean, J.M., Fuller, K., and Chambers, T.J. (2001). FLT3 ligand can substitute for macrophage colony-stimulating factor in support of osteoclast differentiation and function. *Blood* *98*, 2707-2713.

Lee, P.S., Wang, Y., Dominguez, M.G., Yeung, Y.G., Murphy, M.A., Bowtell, D.D., and Stanley, E.R. (1999). The Cbl protooncoprotein stimulates CSF-1 receptor multiubiquitination and endocytosis, and attenuates macrophage proliferation. *EMBO J.* *18*, 3616-3628.

Lee, S.E., Woo, K.M., Kim, S.Y., Kim, H.M., Kwack, K., Lee, Z.H., and Kim, H.H. (2002a). The phosphatidylinositol 3-kinase, p38, and extracellular signal-regulated kinase pathways are involved in osteoclast differentiation. *Bone* *30*, 71-77.

Lee, S.W., Han, S.I., Kim, H.H., and Lee, Z.H. (2002b). TAK1-dependent activation of AP-1 and c-Jun N-terminal kinase by receptor activator of NF-kappaB. *J. Biochem. Mol. Biol.* *35*, 371-376.

Lee, Z.H. and Kim, H.H. (2003). Signal transduction by receptor activator of nuclear factor kappa B in osteoclasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *305*, 211-214.

Lee, Z.H., Kwack, K., Kim, K.K., Lee, S.H., and Kim, H.H. (2000). Activation of c-Jun N-terminal kinase and activator protein 1 by receptor activator of nuclear factor kappaB. *Mol. Pharmacol.* *58*, 1536-1545.

Lee, Z.H., Lee, S.E., Kim, C.W., Lee, S.H., Kim, S.W., Kwack, K., Walsh, K., and Kim, H.H. (2002c). IL-1alpha stimulation of osteoclast survival through the PI 3-kinase/Akt and ERK pathways. *J. Biochem. (Tokyo)* *131*, 161-166.

Lemmon, M.A. and Ferguson, K.M. (2000). Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem. J.* 350 Pt 1, 1-18.

Li, H., Cuartas, E., Cui, W., Choi, Y., Crawford, T.D., Ke, H.Z., Kobayashi, K.S., Flavell, R.A., and Vignery, A. (2005). IL-1 receptor-associated kinase M is a central regulator of osteoclast differentiation and activation. *J. Exp. Med.* 201, 1169-1177.

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. (2000). 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.

Li, X., Masinde, G., Gu, W., Wergedal, J., Mohan, S., and Baylink, D.J. (2002a). Genetic dissection of femur breaking strength in a large population (MRL/MpJ x SJL/J) of F2 Mice: single QTL effects, epistasis, and pleiotropy. *Genomics* 79, 734-740.

Li, X., Udagawa, N., Itoh, K., Suda, K., Murase, Y., Nishihara, T., Suda, T., and Takahashi, N. (2002b). p38 MAPK-mediated signals are required for inducing osteoclast differentiation but not for osteoclast function. *Endocrinology* 143, 3105-3113.

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.

Liliental, J., Moon, S.Y., Lesche, R., Mamillapalli, R., Li, D., Zheng, Y., Sun, H., and Wu, H. (2000). Genetic deletion of the Pten tumor suppressor gene promotes cell motility by activation of Rac1 and Cdc42 GTPases. *Curr. Biol.* 10, 401-404.

Linder, S. and Aepfelbacher, M. (2003). Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol.* 13, 376-385.

Liu, L., Damen, J.E., Hughes, M.R., Babic, I., Jirik, F.R., and Krystal, G. (1997). The Src homology 2 (SH2) domain of SH2-containing inositol phosphatase (SHIP) is essential for tyrosine phosphorylation of SHIP, its association with Shc, and its induction of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 8983-8988.

Liu, L., Jefferson, A.B., Zhang, X., Norris, F.A., Majerus, P.W., and Krystal, G. (1996). A novel phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase associates with the interleukin-3 receptor. *J. Biol. Chem.* 271, 29729-29733.

Liu, Q., Shalaby, F., Jones, J., Bouchard, D., and Dumont, D.J. (1998). The SH2-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase, ship, is expressed during hematopoiesis and spermatogenesis. *Blood* 91, 2753-2759.

- Liu, Y., Festing, M.H., Hester, M., Thompson, J.C., and Weinstein, M. (2004). Generation of novel conditional and hypomorphic alleles of the Smad2 gene. *Genesis*. *40*, 118-123.
- Liu, Z., Xu, J., Colvin, J.S., and Ornitz, D.M. (2002). Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by fibroblast growth factor 18. *Genes Dev.* *16*, 859-869.
- Logan, C.Y. and Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *20*, 781-810.
- Loijens, J.C. and Anderson, R.A. (1996). Type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases are distinct members of this novel lipid kinase family. *J. Biol. Chem.* *271*, 32937-32943.
- 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.
- Long, F., Schipani, E., Asahara, H., Kronenberg, H., and Montminy, M. (2001). The CREB family of activators is required for endochondral bone development. *Development* *128*, 541-550.
- Loveridge, N. (1999). Bone: more than a stick. *J. Anim Sci.* *77 Suppl 2:190-6.*, 190-196.
- 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.
- Luo, B., Regier, D.S., Prescott, S.M., and Topham, M.K. (2004). Diacylglycerol kinases. *Cell Signal.* *16*, 983-989.
- Luo, H.R., Huang, Y.E., Chen, J.C., Saiardi, A., Iijima, M., Ye, K., Huang, Y., Nagata, E., Devreotes, P., and Snyder, S.H. (2003). Inositol pyrophosphates mediate chemotaxis in Dictyostelium via pleckstrin homology domain-PtdIns(3,4,5)P3 interactions. *Cell* *114*, 559-572.
- Maehama, T. and Dixon, J.E. (1999). PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. *Trends Cell Biol.* *9*, 125-128.
- Maehama, T., Taylor, G.S., and Dixon, J.E. (2001). PTEN and myotubularin: novel phosphoinositide phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* *70*, 247-279.

Mahimainathan,L. and Choudhury,G.G. (2004). Inactivation of platelet-derived growth factor receptor by the tumor suppressor PTEN provides a novel mechanism of action of the phosphatase. *J. Biol. Chem.* 279, 15258-15268.

Majerus,P.W., Kisseleva,M.V., and Norris,F.A. (1999). The role of phosphatases in inositol signaling reactions. *J. Biol. Chem.* 274, 10669-10672.

Mak,B.C. and Yeung,R.S. (2004). The tuberous sclerosis complex genes in tumor development. *Cancer Invest* 22, 588-603.

Mancini,A., Koch,A., Wilms,R., and Tamura,T. (2002). c-Cbl associates directly with the C-terminal tail of the receptor for the macrophage colony-stimulating factor, c-Fms, and down-modulates this receptor but not the viral oncogene v-Fms. *J. Biol. Chem.* 277, 14635-14640.

Mansky,K.C., Sankar,U., Han,J., and Ostrowski,M.C. (2002). Microphthalmia transcription factor is a target of the p38 MAPK pathway in response to receptor activator of NF-kappa B ligand signaling. *J. Biol. Chem.* 277, 11077-11083.

Mao,Y., Nickitenko,A., Duan,X., Lloyd,T.E., Wu,M.N., Bellen,H., and Quioco,F.A. (2000). Crystal structure of the VHS and FYVE tandem domains of Hrs, a protein involved in membrane trafficking and signal transduction. *Cell* 100, 447-456.

Maquat,L.E. (2004). Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 89-99.

Marie,N., Lindsay,A.J., and McCaffrey,M.W. (2005). Rab coupling protein is selectively degraded by calpain in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner. *Biochem. J.* 389, 223-231.

Martin,T.F. (2001). PI(4,5)P(2) regulation of surface membrane traffic. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 493-499.

Massague,J. and Wotton,D. (2000). Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.* 19, 1745-1754.

Matsumoto,M., Kogawa,M., Wada,S., Takayanagi,H., Tsujimoto,M., Katayama,S., Hisatake,K., and Nogi,Y. (2004). Essential role of p38 mitogen-activated protein kinase in cathepsin K gene expression during osteoclastogenesis through association of NFATc1 and PU.1. *J. Biol. Chem.* 279, 45969-45979.

Matsumoto,M., Sudo,T., Saito,T., Osada,H., and Tsujimoto,M. (2000). Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL). *J. Biol. Chem.* 275, 31155-31161.

Matsuo,K., Galson,D.L., Zhao,C., Peng,L., Laplace,C., Wang,K.Z., Bachler,M.A., Amano,H., Aburatani,H., Ishikawa,H., and Wagner,E.F. (2004). Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) rescues osteoclastogenesis in precursors lacking c-Fos. *J. Biol. Chem.* *279*, 26475-26480.

Matsuo,K., Owens,J.M., Tonko,M., Elliott,C., Chambers,T.J., and Wagner,E.F. (2000). Fos11 is a transcriptional target of c-Fos during osteoclast differentiation. *Nat. Genet.* *24*, 184-187.

Mattsson,J.P., Schlesinger,P.H., Keeling,D.J., Teitelbaum,S.L., Stone,D.K., and Xie,X.S. (1994). Isolation and reconstitution of a vacuolar-type proton pump of osteoclast membranes. *J. Biol. Chem.* *269*, 24979-24982.

Mayer,B.J., Ren,R., Clark,K.L., and Baltimore,D. (1993). A putative modular domain present in diverse signaling proteins. *Cell* *73*, 629-630.

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.

Michigami,T., Kageyama,T., Satomura,K., Shima,M., Yamaoka,K., Nakayama,M., and Ozono,K. (2002). Novel mutations in the  $\alpha 3$  subunit of vacuolar H(+)-adenosine triphosphatase in a Japanese patient with infantile malignant osteopetrosis. *Bone* *30*, 436-439.

Minogue,S., Anderson,J.S., Waugh,M.G., dos,S.M., Corless,S., Cramer,R., and Hsuan,J.J. (2001). Cloning of a human type II phosphatidylinositol 4-kinase reveals a novel lipid kinase family. *J. Biol. Chem.* *276*, 16635-16640.

Mirosavljevic,D., Quinn,J.M., Elliott,J., Horwood,N.J., Martin,T.J., and Gillespie,M.T. (2003). T-cells mediate an inhibitory effect of interleukin-4 on osteoclastogenesis. *J. Bone Miner. Res.* *18*, 984-993.

Misra,S. and Hurley,J.H. (1999). Crystal structure of a phosphatidylinositol 3-phosphate-specific membrane-targeting motif, the FYVE domain of Vps27p. *Cell* *97*, 657-666.

Mitra,P., Zhang,Y., Rameh,L.E., Ivshina,M.P., McCollum,D., Nunnari,J.J., Hendricks,G.M., Kerr,M.L., Field,S.J., Cantley,L.C., and Ross,A.H. (2004). A novel phosphatidylinositol(3,4,5)P3 pathway in fission yeast. *J. Cell Biol.* *166*, 205-211.

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.

Miyazaki,T., Sanjay,A., Neff,L., Tanaka,S., Horne,W.C., and Baron,R. (2004). Src kinase activity is essential for osteoclast function. *J. Biol. Chem.* 279, 17660-17666.

Mizukami,J., Takaesu,G., Akatsuka,H., Sakurai,H., Ninomiya-Tsuji,J., Matsumoto,K., and Sakurai,N. (2002). Receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) activates TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase through a signaling complex containing RANK, TAB2, and TRAF6. *Mol. Cell Biol.* 22, 992-1000.

Mocsai,A., Humphrey,M.B., Van Ziffle,J.A., Hu,Y., Burghardt,A., Spusta,S.C., Majumdar,S., Lanier,L.L., Lowell,C.A., and Nakamura,M.C. (2004). The immunomodulatory adapter proteins DAP12 and Fc receptor gamma-chain (FcRgamma) regulate development of functional osteoclasts through the Syk tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 6158-6163.

Morony,S., Capparelli,C., Lee,R., Shimamoto,G., Boone,T., Lacey,D.L., and Dunstan,C.R. (1999). A chimeric form of osteoprotegerin inhibits hypercalcemia and bone resorption induced by IL-1beta, TNF-alpha, PTH, PTHrP, and 1, 25(OH)2D3. *J. Bone Miner. Res.* 14, 1478-1485.

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.

Munaut,C., Salonurmi,T., Kontusaari,S., Reponen,P., Morita,T., Foidart,J.M., and Tryggvason,K. (1999). Murine matrix metalloproteinase 9 gene. 5'-upstream region contains cis-acting elements for expression in osteoclasts and migrating keratinocytes in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 274, 5588-5596.

Munday,A.D., Norris,F.A., Caldwell,K.K., Brown,S., Majerus,P.W., and Mitchell,C.A. (1999). The inositol polyphosphate 4-phosphatase forms a complex with phosphatidylinositol 3-kinase in human platelet cytosol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 3640-3645.

Mundlos,S., Otto,F., Mundlos,C., Mulliken,J.B., Aylsworth,A.S., Albright,S., Lindhout,D., Cole,W.G., Henn,W., Knoll,J.H., Owen,M.J., Mertelsmann,R., Zabel,B.U., and Olsen,B.R. (1997). Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 89, 773-779.

Myint,Y.Y., Miyakawa,K., Naito,M., Shultz,L.D., Oike,Y., Yamamura,K., and Takahashi,K. (1999). Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 correct osteopetrosis in mice with osteopetrosis mutation. *Am. J. Pathol.* 154, 553-566.

Naito,A., Azuma,S., Tanaka,S., Miyazaki,T., Takaki,S., Takatsu,K., Nakao,K., Nakamura,K., Katsuki,M., Yamamoto,T., and Inoue,J. (1999). Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signalling and lymph node organogenesis in TRAF6-deficient mice. *Genes Cells* 4, 353-362.

Nakagawa,T., Goto,K., and Kondo,H. (1996). Cloning and characterization of a 92 kDa soluble phosphatidylinositol 4-kinase. *Biochem. J.* 320 ( Pt 2), 643-649.

Nakamura,I., Jimi,E., Duong,L.T., Sasaki,T., Takahashi,N., Rodan,G.A., and Suda,T. (1998). Tyrosine phosphorylation of p130Cas is involved in actin organization in osteoclasts. *J. Biol. Chem.* 273, 11144-11149.

Nakamura,I., Rodan,G.A., and Duong,L.T. (2003). Distinct roles of p130Cas and c-Cbl in adhesion-induced or macrophage colony-stimulating factor-mediated signaling pathways in perfusion osteoclasts. *Endocrinology* 144, 4739-4741.

Nakamura,I., Takahashi,N., Sasaki,T., Tanaka,S., Udagawa,N., Murakami,H., Kimura,K., Kabuyama,Y., Kurokawa,T., Suda,T., and . (1995). Wortmannin, a specific inhibitor of phosphatidylinositol-3 kinase, blocks osteoclastic bone resorption. *FEBS Lett.* 361, 79-84.

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.

Nalefski,E.A. and Falke,J.J. (1996). The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci.* 5, 2375-2390.

Naski,M.C., Colvin,J.S., Coffin,J.D., and Ornitz,D.M. (1998). Repression of hedgehog signaling and BMP4 expression in growth plate cartilage by fibroblast growth factor receptor 3. *Development* 125, 4977-4988.

Naski,M.C., Wang,Q., Xu,J., and Ornitz,D.M. (1996). Graded activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations causing achondroplasia and thanatophoric dysplasia. *Nat. Genet.* 13, 233-237.

Nemoto,Y., Kearns,B.G., Wenk,M.R., Chen,H., Mori,K., Alb,J.G., Jr., De Camilli,P., and Bankaitis,V.A. (2000). Functional characterization of a mammalian Sac1 and mutants exhibiting substrate-specific defects in phosphoinositide phosphatase activity. *J. Biol. Chem.* 275, 34293-34305.

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.

Nishimura,N., Bannykh,S., Slabough,S., Matteson,J., Altschuler,Y., Hahn,K., and Balch,W.E. (1999). A di-acidic (DXE) code directs concentration of cargo during export from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 274, 15937-15946.

Noack,D., Rae,J., Cross,A.R., Ellis,B.A., Newburger,P.E., Curnutte,J.T., and Heyworth,P.G. (2001). Autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by defects in NCF-1, the gene encoding the phagocyte p47-phox: mutations not arising in the NCF-1 pseudogenes. *Blood* 97, 305-311.

Norris,F.A., Atkins,R.C., and Majerus,P.W. (1997a). Inositol polyphosphate 4-phosphatase is inactivated by calpain-mediated proteolysis in stimulated human platelets. *J. Biol. Chem.* 272, 10987-10989.

Norris,F.A., Atkins,R.C., and Majerus,P.W. (1997b). The cDNA cloning and characterization of inositol polyphosphate 4- phosphatase type II. Evidence for conserved alternative splicing in the 4-phosphatase family. *J. Biol. Chem.* 272, 23859-23864.

Norris,F.A., Auethavekiat,V., and Majerus,P.W. (1995). The isolation and characterization of cDNA encoding human and rat brain inositol polyphosphate 4-phosphatase. *J. Biol. Chem.* 270, 16128-16133.

Norris,F.A. and Majerus,P.W. (1994). Hydrolysis of phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate by inositol polyphosphate 4-phosphatase isolated by affinity elution chromatography. *J. Biol. Chem.* 269, 8716-8720.

Nystuen,A., Legare,M.E., Shultz,L.D., and Frankel,W.N. (2001). A null mutation in inositol polyphosphate 4-phosphatase type I causes selective neuronal loss in weeble mutant mice. *Neuron* 32, 203-212.

Ogata,Y., Kukita,A., Kukita,T., Komine,M., Miyahara,A., Miyazaki,S., and Kohashi,O. (1999). A novel role of IL-15 in the development of osteoclasts: inability to replace its activity with IL-2. *J. Immunol.* 162, 2754-2760.

Ohbayashi,N., Shibayama,M., Kurotaki,Y., Imanishi,M., Fujimori,T., Itoh,N., and Takada,S. (2002). FGF18 is required for normal cell proliferation and differentiation during osteogenesis and chondrogenesis. *Genes Dev.* 16, 870-879.

Okigaki,M., Davis,C., Falasca,M., Harroch,S., Felsenfeld,D.P., Sheetz,M.P., and Schlessinger,J. (2003). Pyk2 regulates multiple signaling events crucial for macrophage morphology and migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 10740-10745.

Okkenhaug,K., Bilancio,A., Farjot,G., Priddle,H., Sancho,S., Peskett,E., Pearce,W., Meek,S.E., Salpekar,A., Waterfield,M.D., Smith,A.J., and Vanhaesebroeck,B. (2002).

Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110delta PI 3-kinase mutant mice. *Science* 297, 1031-1034.

Orwoll,E.S., Belknap,J.K., and Klein,R.F. (2001). Gender specificity in the genetic determinants of peak bone mass. *J. Bone Miner. Res.* 16, 1962-1971.

Otto,F., Thornell,A.P., Crompton,T., Denzel,A., Gilmour,K.C., Rosewell,I.R., Stamp,G.W., Beddington,R.S., Mundlos,S., Olsen,B.R., Selby,P.B., and Owen,M.J. (1997). *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89, 765-771.

Overduin,M., Cheever,M.L., and Kutateladze,T.G. (2001). Signaling with phosphoinositides: better than binary. *Mol. Interv.* 1, 150-159.

Panaretou,C., Domin,J., Cockcroft,S., and Waterfield,M.D. (1997). Characterization of p150, an adaptor protein for the human phosphatidylinositol (PtdIns) 3-kinase. Substrate presentation by phosphatidylinositol transfer protein to the p150.Ptdins 3-kinase complex. *J. Biol. Chem.* 272, 2477-2485.

Parker,P.J., Coussens,L., Totty,N., Rhee,L., Young,S., Chen,E., Stabel,S., Waterfield,M.D., and Ullrich,A. (1986). The complete primary structure of protein kinase C--the major phorbol ester receptor. *Science* 233, 853-859.

Peng,X.D., Xu,P.Z., Chen,M.L., Hahn-Windgassen,A., Skeen,J., Jacobs,J., Sundararajan,D., Chen,W.S., Crawford,S.E., Coleman,K.G., and Hay,N. (2003). Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes Dev.* 17, 1352-1365.

Pfaff,M. and Jurdic,P. (2001). Podosomes in osteoclast-like cells: structural analysis and cooperative roles of paxillin, proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) and integrin alphaVbeta3. *J. Cell Sci.* 114, 2775-2786.

Podsypanina,K., Ellenson,L.H., Nemes,A., Gu,J., Tamura,M., Yamada,K.M., Cordon-Cardo,C., Catorretti,G., Fisher,P.E., and Parsons,R. (1999). Mutation of *Pten/Mmac1* in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 1563-1568.

Ponting,C.P. (1996). Novel domains in NADPH oxidase subunits, sorting nexins, and PtdIns 3-kinases: binding partners of SH3 domains? *Protein Sci.* 5, 2353-2357.

Prior,I.A. and Clague,M.J. (1999). Localization of a class II phosphatidylinositol 3-kinase, PI3KC2alpha, to clathrin-coated vesicles. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* 1, 162-166.

Puius,Y.A., Fedorov,E.V., Eichinger,L., Schleicher,M., and Almo,S.C. (2000). Mapping the functional surface of domain 2 in the gelsolin superfamily. *Biochemistry* 39, 5322-5331.

Quarello,P., Forni,M., Barberis,L., Defilippi,C., Campagnoli,M.F., Silvestro,L., Frattini,A., Chalhoub,N., Vacher,J., and Ramenghi,U. (2004). Severe malignant osteopetrosis caused by a GL gene mutation. *J. Bone Miner. Res.* 19, 1194-1199.

Quinn,J.M. and Gillespie,M.T. (2005). Modulation of osteoclast formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 739-745.

Raghunathan,V., Mowery,P., Rozycki,M., Lindberg,U., and Schutt,C. (1992). Structural changes in profilin accompany its binding to phosphatidylinositol, 4,5-bisphosphate. *FEBS Lett.* 297, 46-50.

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.

Ralston,S.H., Galwey,N., MacKay,I., Albagha,O.M., Cardon,L., Compston,J.E., Cooper,C., Duncan,E., Keen,R., Langdahl,B., McLellan,A., O'Riordan,J., Pols,H.A., Reid,D.M., Uitterlinden,A.G., Wass,J., and Bennett,S.T. (2005). Loci for regulation of bone mineral density in men and women identified by genome wide linkage scan: the FAMOS study. *Hum. Mol. Genet.* 14, 943-951.

Rameh,L.E., Chen,C.S., and Cantley,L.C. (1995). Phosphatidylinositol (3,4,5)P3 interacts with SH2 domains and modulates PI 3-kinase association with tyrosine-phosphorylated proteins. *Cell* 83, 821-830.

Rameh,L.E., Rhee,S.G., Spokes,K., Kazlauskas,A., Cantley,L.C., and Cantley,L.G. (1998). Phosphoinositide 3-kinase regulates phospholipase Cgamma-mediated calcium signaling. *J. Biol. Chem.* 273, 23750-23757.

Rameh,L.E., Tolias,K.F., Duckworth,B.C., and Cantley,L.C. (1997). A new pathway for synthesis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* 390, 192-196.

Ramirez,A., Faupel,J., Goebel,I., Stiller,A., Beyer,S., Stockle,C., Hasan,C., Bode,U., Kornak,U., and Kubisch,C. (2004). Identification of a novel mutation in the coding region of the grey-lethal gene OSTM1 in human malignant infantile osteopetrosis. *Hum. Mutat.* 23, 471-476.

Ranger,A.M., Grusby,M.J., Hodge,M.R., Gravalles,E.M., de la Brousse,F.C., Hoey,T., Mickanin,C., Baldwin,H.S., and Glimcher,L.H. (1998). The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation. *Nature* 392, 186-190.

- Rao,A., Luo,C., and Hogan,P.G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 707-747.
- Rechsteiner,M. and Rogers,S.W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* 21, 267-271.
- Rodan,G.A. and Martin,T.J. (2000). Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 289, 1508-1514.
- Rohde,H.M., Cheong,F.Y., Konrad,G., Paiha,K., Mayinger,P., and Boehmelt,G. (2003). The human phosphatidylinositol phosphatase SAC1 interacts with the coatamer I complex. *J. Biol. Chem.* 278, 52689-52699.
- Rosenfeldt,H., Vazquez-Prado,J., and Gutkind,J.S. (2004). P-REX2, a novel PI-3-kinase sensitive Rac exchange factor. *FEBS Lett.* 572, 167-171.
- Ross,T.S., Jefferson,A.B., Mitchell,C.A., and Majerus,P.W. (1991). Cloning and expression of human 75-kDa inositol polyphosphate-5-phosphatase. *J. Biol. Chem.* 266, 20283-20289.
- Rousseau,F., Bonaventure,J., Legeai-Mallet,L., Pelet,A., Rozet,J.M., Maroteaux,P., Le Merrer,M., and Munnich,A. (1994). Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature* 371, 252-254.
- Roussel,M.F. (1997). Regulation of cell cycle entry and G1 progression by CSF-1. *Mol. Reprod. Dev.* 46, 11-18.
- Rubino,M., Miaczynska,M., Lippe,R., and Zerial,M. (2000). Selective membrane recruitment of EEA1 suggests a role in directional transport of clathrin-coated vesicles to early endosomes. *J. Biol. Chem.* 275, 3745-3748.
- Rudge,S.A., Anderson,D.M., and Emr,S.D. (2004). Vacuole size control: regulation of PtdIns(3,5)P2 levels by the vacuole-associated Vac14-Fig4 complex, a PtdIns(3,5)P2-specific phosphatase. *Mol. Biol. Cell* 15, 24-36.
- Ruocco,M.G., Maeda,S., Park,J.M., Lawrence,T., Hsu,L.C., Cao,Y., Schett,G., Wagner,E.F., and Karin,M. (2005). I $\kappa$ B kinase (IKK) $\beta$ , but not IKK $\alpha$ , is a critical mediator of osteoclast survival and is required for inflammation-induced bone loss. *J. Exp. Med.* 201, 1677-1687.
- Saba-El-Leil,M.K., Vella,F.D., Vernay,B., Voisin,L., Chen,L., Labrecque,N., Ang,S.L., and Meloche,S. (2003). An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development. *EMBO Rep.* 4, 964-968.
- 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.

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.

Santagata,S., Boggon,T.J., Baird,C.L., Gomez,C.A., Zhao,J., Shan,W.S., Myszka,D.G., and Shapiro,L. (2001). G-protein signaling through tubby proteins. *Science* 292, 2041-2050.

Sasaki,T., Irie-Sasaki,J., Jones,R.G., Oliveira-dos-Santos,A.J., Stanford,W.L., Bolon,B., Wakeham,A., Itie,A., Bouchard,D., Koziaradzki,I., Joza,N., Mak,T.W., Ohashi,P.S., Suzuki,A., and Penninger,J.M. (2000). Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science* 287, 1040-1046.

Satokata,I., Ma,L., Ohshima,H., Bei,M., Woo,I., Nishizawa,K., Maeda,T., Takano,Y., Uchiyama,M., Heaney,S., Peters,H., Tang,Z., Maxson,R., and Maas,R. (2000). Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat. Genet.* 24, 391-395.

Sbrissa,D., Ikonomov,O.C., and Shisheva,A. (2002). Phosphatidylinositol 3-phosphate-interacting domains in PIKfyve. Binding specificity and role in PIKfyve. Endomembrane localization. *J. Biol. Chem.* 277, 6073-6079.

Schaletzky,J., Dove,S.K., Short,B., Lorenzo,O., Clague,M.J., and Barr,F.A. (2003). Phosphatidylinositol-5-phosphate activation and conserved substrate specificity of the myotubularin phosphatidylinositol 3-phosphatases. *Curr. Biol.* 13, 504-509.

Schoppet,M., Preissner,K.T., and Hofbauer,L.C. (2002). RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 549-553.

Schu,P.V., Takegawa,K., Fry,M.J., Stack,J.H., Waterfield,M.D., and Emr,S.D. (1993). Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science* 260, 88-91.

Schultz,J., Copley,R.R., Doerks,T., Ponting,C.P., and Bork,P. (2000). SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Res.* 28, 231-234.

Schwartzberg,P.L., Xing,L., Hoffmann,O., Lowell,C.A., Garrett,L., Boyce,B.F., and Varmus,H.E. (1997). Rescue of osteoclast function by transgenic expression of kinase-deficient Src in src<sup>-/-</sup> mutant mice. *Genes Dev.* 11, 2835-2844.

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.

Sechi, A.S. and Wehland, J. (2000). The actin cytoskeleton and plasma membrane connection: PtdIns(4,5)P(2) influences cytoskeletal protein activity at the plasma membrane. *J. Cell Sci.* 113 Pt 21, 3685-3695.

Selvamurugan, N., Chou, W.Y., Pearman, A.T., Pulumati, M.R., and Partridge, N.C. (1998). Parathyroid hormone regulates the rat collagenase-3 promoter in osteoblastic cells through the cooperative interaction of the activator protein-1 site and the runt domain binding sequence. *J. Biol. Chem.* 273, 10647-10657.

Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F.R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S.C., and Karin, M. (2001). Activation by IKK $\alpha$  of a second, evolutionary conserved, NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Science* 293, 1495-1499.

Shearn, C.T., Walker, J., and Norris, F.A. (2001). Identification of a novel spliceoform of inositol polyphosphate 4-phosphatase type I $\alpha$  expressed in human platelets: structure of human inositol polyphosphate 4-phosphatase type I gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286, 119-125.

Shiang, R., Thompson, L.M., Zhu, Y.Z., Church, D.M., Fielder, T.J., Bocian, M., Winokur, S.T., and Wasmuth, J.J. (1994). Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell* 78, 335-342.

Shibasaki, Y., Ishihara, H., Kizuki, N., Asano, T., Oka, Y., and Yazaki, Y. (1997). Massive actin polymerization induced by phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase in vivo. *J. Biol. Chem.* 272, 7578-7581.

Shin, H.W., Hayashi, M., Christoforidis, S., Lacas-Gervais, S., Hoepfner, S., Wenk, M.R., Modregger, J., Uttenweiler-Joseph, S., Wilm, M., Nystuen, A., Frankel, W.N., Solimena, M., De Camilli, P., and Zerial, M. (2005). An enzymatic cascade of Rab5 effectors regulates phosphoinositide turnover in the endocytic pathway. *J. Cell Biol.* 170, 607-618.

Shivdasani, R.A., Fujiwara, Y., McDevitt, M.A., and Orkin, S.H. (1997). A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *EMBO J.* 16, 3965-3973.

Shui, C., Riggs, B.L., and Khosla, S. (2002). The immunosuppressant rapamycin, alone or with transforming growth factor-beta, enhances osteoclast differentiation of RAW264.7 monocyte-macrophage cells in the presence of RANK-ligand. *Calcif. Tissue Int.* 71, 437-446.

Siddhanta,A. and Shields,D. (1998). Secretory vesicle budding from the trans-Golgi network is mediated by phosphatidic acid levels. *J. Biol. Chem.* 273, 17995-17998.

Siebenlist,U., Brown,K., and Claudio,E. (2005). Control of lymphocyte development by nuclear factor-kappaB. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 435-445.

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., Sander,S., Van,G., Tarpley,J., Derby,P., Lee,R., and Boyle,W.J. (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89, 309-319.

Simonsen,A., Lippe,R., Christoforidis,S., Gaullier,J.M., Brech,A., Callaghan,J., Toh,B.H., Murphy,C., Zerial,M., and Stenmark,H. (1998). EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* 394, 494-498.

Simpson,L. and Parsons,R. (2001). PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp. Cell Res.* 264, 29-41.

Sleeman,M.W., Wortley,K.E., Lai,K.M., Gowen,L.C., Kintner,J., Kline,W.O., Garcia,K., Stitt,T.N., Yancopoulos,G.D., Wiegand,S.J., and Glass,D.J. (2005). Absence of the lipid phosphatase SHIP2 confers resistance to dietary obesity. *Nat. Med.* 11, 199-205.

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.

Song,H.Y., Regnier,C.H., Kirschning,C.J., Goeddel,D.V., and Rothe,M. (1997). Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades: bifurcation of nuclear factor-kappaB and c-jun N-terminal kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor-associated factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 9792-9796.

Song,X., Xu,W., Zhang,A., Huang,G., Liang,X., Virbasius,J.V., Czech,M.P., and Zhou,G.W. (2001). Phox homology domains specifically bind phosphatidylinositol phosphates. *Biochemistry* 40, 8940-8944.

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.

Speed,C.J., Little,P.J., Hayman,J.A., and Mitchell,C.A. (1996). Underexpression of the 43 kDa inositol polyphosphate 5-phosphatase is associated with cellular transformation. *EMBO J.* 15, 4852-4861.

Spencer,M.L., Theodosiou,M., and Noonan,D.J. (2004). NPDC-1, a novel regulator of neuronal proliferation, is degraded by the ubiquitin/proteasome system through a PEST degradation motif. *J. Biol. Chem.* 279, 37069-37078.

St Jacques,B., Hammerschmidt,M., and McMahon,A.P. (1999). Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.* 13, 2072-2086.

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.

Stephens,L.R., Eguinoa,A., Erdjument-Bromage,H., Lui,M., Cooke,F., Coadwell,J., Smrcka,A.S., Thelen,M., Cadwallader,K., Tempst,P., and Hawkins,P.T. (1997). The G beta gamma sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell* 89, 105-114.

Stoyanov,B., Volinia,S., Hanck,T., Rubio,I., Loubtchenkov,M., Malek,D., Stoyanova,S., Vanhaesebroeck,B., Dhand,R., Nurnberg,B., and . (1995). Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science* 269, 690-693.

Suchy,S.F., Olivos-Glander,I.M., and Nussbaum,R.L. (1995). Lowe syndrome, a deficiency of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 5-phosphatase in the Golgi apparatus. *Hum. Mol. Genet.* 4, 2245-2250.

Sugatani,T., Alvarez,U., and Hruska,K.A. (2003). PTEN regulates RANKL- and osteopontin-stimulated signal transduction during osteoclast differentiation and cell motility. *J. Biol. Chem.* 278, 5001-5008.

Sugatani,T. and Hruska,K.A. (2005). Akt1/Akt2 and mammalian target of rapamycin/Bim play critical roles in osteoclast differentiation and survival, respectively, whereas Akt is dispensable for cell survival in isolated osteoclast precursors. *J. Biol. Chem.* 280, 3583-3589.

Sulis,M.L. and Parsons,R. (2003). PTEN: from pathology to biology. *Trends Cell Biol.* 13, 478-483.

Susa,M., Luong-Nguyen,N.H., Cappellen,D., Zamurovic,N., and Gamse,R. (2004). Human primary osteoclasts: in vitro generation and applications as pharmacological and clinical assay. *J. Transl. Med.* 2, 6.

Suzuki,A., de la Pompa,J.L., Stambolic,V., Elia,A.J., Sasaki,T., del,B.B., I, Ho,A., Wakeham,A., Itie,A., Khoo,W., Fukumoto,M., and Mak,T.W. (1998). High cancer

susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. *Curr. Biol.* 8, 1169-1178.

Suzuki,H., Terauchi,Y., Fujiwara,M., Aizawa,S., Yazaki,Y., Kadowaki,T., and Koyasu,S. (1999). Xid-like immunodeficiency in mice with disruption of the p85alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Science* 283, 390-392.

Takahashi,N., Akatsu,T., Udagawa,N., Sasaki,T., Yamaguchi,A., Moseley,J.M., Martin,T.J., and Suda,T. (1988). Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* 123, 2600-2602.

Takahashi,N., Udagawa,N., and Suda,T. (1999). A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256, 449-455.

Takai,T. (2002). Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 580-592.

Takayanagi,H. (2005). Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J. Mol. Med.* 83, 170-179.

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. (2002a). Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev. Cell* 3, 889-901.

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. (2002b). RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta. *Nature* 416, 744-749.

Takayanagi,H., Ogasawara,K., Hida,S., Chiba,T., Murata,S., Sato,K., Takaoka,A., Yokochi,T., Oda,H., Tanaka,K., Nakamura,K., and Taniguchi,T. (2000). T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature* 408, 600-605.

Takeda,S., Bonnamy,J.P., Owen,M.J., Ducy,P., and Karsenty,G. (2001). Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. *Genes Dev.* 15, 467-481.

Takeda,S., Eleftheriou,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.

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.

Tavormina,P.L., Shiang,R., Thompson,L.M., Zhu,Y.Z., Wilkin,D.J., Lachman,R.S., Wilcox,W.R., Rimoin,D.L., Cohn,D.H., and Wasmuth,J.J. (1995). Thanatophoric dysplasia (types I and II) caused by distinct mutations in fibroblast growth factor receptor 3. *Nat. Genet.* 9, 321-328.

Taylor,G.S., Maehama,T., and Dixon,J.E. (2000). Inaugural article: myotubularin, a protein tyrosine phosphatase mutated in myotubular myopathy, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3-phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 8910-8915.

Tebar,F., Bohlander,S.K., and Sorkin,A. (1999). Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia (CALM) protein: localization in endocytic-coated pits, interactions with clathrin, and the impact of overexpression on clathrin-mediated traffic. *Mol. Biol. Cell* 10, 2687-2702.

Teitelbaum,S.L. (2000). Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289, 1504-1508.

Teitelbaum,S.L. and Ross,F.P. (2003). Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat. Rev. Genet.* 4, 638-649.

Theill,L.E., Boyle,W.J., and Penninger,J.M. (2002). RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 795-823.

Toker,A. and Newton,A.C. (2000). Cellular signaling: pivoting around PDK-1. *Cell* 103, 185-188.

Tolias,K.F., Cantley,L.C., and Carpenter,C.L. (1995). Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases. *J. Biol. Chem.* 270, 17656-17659.

Tolias,K.F., Hartwig,J.H., Ishihara,H., Shibasaki,Y., Cantley,L.C., and Carpenter,C.L. (2000). Type Ialpha phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase mediates Rac-dependent actin assembly. *Curr. Biol.* 10, 153-156.

Tolias,K.F., Rameh,L.E., Ishihara,H., Shibasaki,Y., Chen,J., Prestwich,G.D., Cantley,L.C., and Carpenter,C.L. (1998). Type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases synthesize the novel lipids phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate and phosphatidylinositol 5-phosphate. *J. Biol. Chem.* 273, 18040-18046.

Tompa,P., Buzder-Lantos,P., Tantos,A., Farkas,A., Szilagy,A., Banoczi,Z., Hudecz,F., and Friedrich,P. (2004). On the sequential determinants of calpain cleavage. *J. Biol. Chem.* 279, 20775-20785.

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.

Tribioli,C. and Lufkin,T. (1999). The murine Bapx1 homeobox gene plays a critical role in embryonic development of the axial skeleton and spleen. *Development* 126, 5699-5711.

Turner,S.J., Domin,J., Waterfield,M.D., Ward,S.G., and Westwick,J. (1998). The CC chemokine monocyte chemotactic peptide-1 activates both the class I p85/p110 phosphatidylinositol 3-kinase and the class II PI3K-C2alpha. *J. Biol. Chem.* 273, 25987-25995.

Ueki,K., Fruman,D.A., Brachmann,S.M., Tseng,Y.H., Cantley,L.C., and Kahn,C.R. (2002). Molecular balance between the regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase regulates cell signaling and survival. *Mol. Cell Biol.* 22, 965-977.

Ueta,C., Iwamoto,M., Kanatani,N., Yoshida,C., Liu,Y., Enomoto-Iwamoto,M., Ohmori,T., Enomoto,H., Nakata,K., Takada,K., Kurisu,K., and Komori,T. (2001). Skeletal malformations caused by overexpression of Cbfa1 or its dominant negative form in chondrocytes. *J. Cell Biol.* 153, 87-100.

Ungewickell,A.J. and Majerus,P.W. (1999). Increased levels of plasma lysosomal enzymes in patients with Lowe syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 13342-13344.

Urso,B., Brown,R.A., O'Rahilly,S., Shepherd,P.R., and Siddle,K. (1999). The alpha-isoform of class II phosphoinositide 3-kinase is more effectively activated by insulin receptors than IGF receptors, and activation requires receptor NPEY motifs. *FEBS Lett.* 460, 423-426.

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

Vanhaesebroeck,B., Leever,S.J., Panayotou,G., and Waterfield,M.D. (1997a). Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem. Sci.* 22, 267-272.

Vanhaesebroeck,B., Welham,M.J., Kotani,K., Stein,R., Warne,P.H., Zvelebil,M.J., Higashi,K., Volinia,S., Downward,J., and Waterfield,M.D. (1997b). P110delta, a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 4330-4335.

Viola, J.P., Kiani, A., Bozza, P.T., and Rao, A. (1998). Regulation of allergic inflammation and eosinophil recruitment in mice lacking the transcription factor NFAT1: role of interleukin-4 (IL-4) and IL-5. *Blood* *91*, 2223-2230.

Volinia, S., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., MacDougall, L.K., Stein, R., Zvelebil, M.J., Domin, J., Panaretou, C., and Waterfield, M.D. (1995). A human phosphatidylinositol 3-kinase complex related to the yeast Vps34p-Vps15p protein sorting system. *EMBO J.* *14*, 3339-3348.

Voronina, V.A., Kozlov, S., Mathers, P.H., and Lewandoski, M. (2005). Conditional alleles for activation and inactivation of the mouse Rx homeobox gene. *Genesis*. *41*, 160-164.

Votsmeier, C. and Gallwitz, D. (2001). An acidic sequence of a putative yeast Golgi membrane protein binds COPII and facilitates ER export. *EMBO J.* *20*, 6742-6750.

Vyas, P., Norris, F.A., Joseph, R., Majerus, P.W., and Orkin, S.H. (2000). Inositol polyphosphate 4-phosphatase type I regulates cell growth downstream of transcription factor GATA-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 13696-13701.

Wada, T., Nakashima, T., Oliveira-dos-Santos, A.J., Gasser, J., Hara, H., Schett, G., and Penninger, J.M. (2005). The molecular scaffold Gab2 is a crucial component of RANK signaling and osteoclastogenesis. *Nat. Med.* *11*, 394-399.

Wada, T., Sasaoka, T., Funaki, M., Hori, H., Murakami, S., Ishiki, M., Haruta, T., Asano, T., Ogawa, W., Ishihara, H., and Kobayashi, M. (2001). Overexpression of SH2-containing inositol phosphatase 2 results in negative regulation of insulin-induced metabolic actions in 3T3-L1 adipocytes via its 5'-phosphatase catalytic activity. *Mol. Cell Biol.* *21*, 1633-1646.

Waguespack, S.G., Koller, D.L., White, K.E., Fishburn, T., Carn, G., Buckwalter, K.A., Johnson, M., Kocisko, M., Evans, W.E., Foroud, T., and Econs, M.J. (2003). Chloride channel 7 (ClCN7) gene mutations and autosomal dominant osteopetrosis, type II. *J. Bone Miner. Res.* *18*, 1513-1518.

Walker, D.G. (1975). Bone resorption restored in osteopetrotic mice by transplants of normal bone marrow and spleen cells. *Science* *190*, 784-785.

Walker, D.M., Urbe, S., Dove, S.K., Tenza, D., Raposo, G., and Clague, M.J. (2001a). Characterization of MTMR3, an inositol lipid 3-phosphatase with novel substrate specificity. *Curr. Biol.* *11*, 1600-1605.

Walker, S.M., Downes, C.P., and Leslie, N.R. (2001b). TPIP: a novel phosphoinositide 3-phosphatase. *Biochem. J.* *360*, 277-283.

Wang, Y., Yeung, Y.G., and Stanley, E.R. (1999). CSF-1 stimulated multiubiquitination of the CSF-1 receptor and of Cbl follows their tyrosine phosphorylation and association with other signaling proteins. *J. Cell Biochem.* 72, 119-134.

Wang, Y.J., Wang, J., Sun, H.Q., Martinez, M., Sun, Y.X., Macia, E., Kirchhausen, T., Albanesi, J.P., Roth, M.G., and Yin, H.L. (2003). Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi. *Cell* 114, 299-310.

Watt, S.A., Kular, G., Fleming, I.N., Downes, C.P., and Lucocq, J.M. (2002). Subcellular localization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate using the pleckstrin homology domain of phospholipase C delta 1. *Biochem. J.* 363, 657-666.

Wei, S., Teitelbaum, S.L., Wang, M.W., and Ross, F.P. (2001). Receptor activator of nuclear factor-kappa b ligand activates nuclear factor-kappa b in osteoclast precursors. *Endocrinology* 142, 1290-1295.

Wei, Y.J., Sun, H.Q., Yamamoto, M., Wlodarski, P., Kunii, K., Martinez, M., Barylko, B., Albanesi, J.P., and Yin, H.L. (2002). Type II phosphatidylinositol 4-kinase beta is a cytosolic and peripheral membrane protein that is recruited to the plasma membrane and activated by Rac-GTP. *J. Biol. Chem.* 277, 46586-46593.

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.

Welch, H.C., Coadwell, W.J., Ellson, C.D., Ferguson, G.J., Andrews, S.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Hawkins, P.T., and Stephens, L.R. (2002). P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>- and Gbetagamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell* 108, 809-821.

Wen, R., Jou, S.T., Chen, Y., Hoffmeyer, A., and Wang, D. (2002). Phospholipase C gamma 2 is essential for specific functions of Fc epsilon R and Fc gamma R. *J. Immunol.* 169, 6743-6752.

Wenk, M.R., Pellegrini, L., Klenchin, V.A., Di Paolo, G., Chang, S., Daniell, L., Arioka, M., Martin, T.F., and De Camilli, P. (2001). PIP kinase Igamma is the major PI(4,5)P<sub>2</sub> synthesizing enzyme at the synapse. *Neuron* 32, 79-88.

Whiteford, C.C., Brearley, C.A., and Ulug, E.T. (1997). Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate defines a novel PI 3-kinase pathway in resting mouse fibroblasts. *Biochem. J.* 323 ( Pt 3), 597-601.

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.

Wong,B.R., Besser,D., Kim,N., Arron,J.R., Vologodskaiia,M., Hanafusa,H., and Choi,Y. (1999). TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol. Cell* 4, 1041-1049.

Wong,B.R., Josien,R., Lee,S.Y., Sauter,B., Li,H.L., Steinman,R.M., and Choi,Y. (1997). TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J. Exp. Med.* 186, 2075-2080.

Wozney,J.M., Rosen,V., Celeste,A.J., Mitsock,L.M., Whitters,M.J., Kriz,R.W., Hewick,R.M., and Wang,E.A. (1988). Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242, 1528-1534.

Wu,X.B., Li,Y., Schneider,A., Yu,W., Rajendren,G., Iqbal,J., Yamamoto,M., Alam,M., Brunet,L.J., Blair,H.C., Zaidi,M., and Abe,E. (2003). Impaired osteoblastic differentiation, reduced bone formation, and severe osteoporosis in noggin-overexpressing mice. *J. Clin. Invest* 112, 924-934.

Wu,Y., Dowbenko,D., Pisabarro,M.T., Dillard-Telm,L., Koeppen,H., and Lasky,L.A. (2001). PTEN 2, a Golgi-associated testis-specific homologue of the PTEN tumor suppressor lipid phosphatase. *J. Biol. Chem.* 276, 21745-21753.

Wurmser,A.E., Gary,J.D., and Emr,S.D. (1999). Phosphoinositide 3-kinases and their FYVE domain-containing effectors as regulators of vacuolar/lysosomal membrane trafficking pathways. *J. Biol. Chem.* 274, 9129-9132.

Xanthoudakis,S., Viola,J.P., Shaw,K.T., Luo,C., Wallace,J.D., Bozza,P.T., Luk,D.C., Curran,T., and Rao,A. (1996). An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. *Science* 272, 892-895.

Xian,W. and Janmey,P.A. (2002). Dissecting the gelsolin-polyphosphoinositide interaction and engineering of a polyphosphoinositide-sensitive gelsolin C-terminal half protein. *J. Mol. Biol.* 322, 755-771.

Xu,Y., Hortsman,H., Seet,L., Wong,S.H., and Hong,W. (2001). SNX3 regulates endosomal function through its PX-domain-mediated interaction with PtdIns(3)P. *Nat. Cell Biol.* 3, 658-666.

Yamamoto,A., Miyazaki,T., Kadono,Y., Takayanagi,H., Miura,T., Nishina,H., Katada,T., Wakabayashi,K., Oda,H., Nakamura,K., and Tanaka,S. (2002). Possible involvement of IkappaB kinase 2 and MKK7 in osteoclastogenesis induced by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand. *J. Bone Miner. Res.* 17, 612-621.

Yang,X. and Karsenty,G. (2004). ATF4, the osteoblast accumulation of which is determined post-translationally, can induce osteoblast-specific gene expression in non-osteoblastic cells. *J. Biol. Chem.* 279, 47109-47114.

Yang,X., Matsuda,K., Bialek,P., Jacquot,S., Masuoka,H.C., Schinke,T., Li,L., Brancorsini,S., Sassone-Corsi,P., Townes,T.M., Hanauer,A., and Karsenty,G. (2004). ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell* 117, 387-398.

Yao,G.Q., Sun,B.H., Weir,E.C., and Insogna,K.L. (2002). A role for cell-surface CSF-1 in osteoblast-mediated osteoclastogenesis. *Calcif. Tissue Int.* 70, 339-346.

Yasuda,H., Shima,N., Nakagawa,N., Yamaguchi,K., Kinosaki,M., Mochizuki,S., Tomoyasu,A., Yano,K., Goto,M., Murakami,A., Tsuda,E., Morinaga,T., Higashio,K., Udagawa,N., Takahashi,N., and Suda,T. (1998). Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 3597-3602.

Yokouchi,M., Kondo,T., Sanjay,A., Houghton,A., Yoshimura,A., Komiya,S., Zhang,H., and Baron,R. (2001). Src-catalyzed phosphorylation of c-Cbl leads to the interdependent ubiquitination of both proteins. *J. Biol. Chem.* 276, 35185-35193.

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.

Young,P. and Gautel,M. (2000). The interaction of titin and alpha-actinin is controlled by a phospholipid-regulated intramolecular pseudoligand mechanism. *EMBO J.* 19, 6331-6340.

Yousfi,M., Lasmoles,F., El,G., V, and Marie,P.J. (2002). Twist haploinsufficiency in Saethre-Chotzen syndrome induces calvarial osteoblast apoptosis due to increased TNFalpha expression and caspase-2 activation. *Hum. Mol. Genet.* 11, 359-369.

Yu,J., Wjasow,C., and Backer,J.M. (1998a). Regulation of the p85/p110alpha phosphatidylinositol 3'-kinase. Distinct roles for the n-terminal and c-terminal SH2 domains. *J. Biol. Chem.* 273, 30199-30203.

Yu,J., Zhang,Y., McIlroy,J., Rordorf-Nikolic,T., Orr,G.A., and Backer,J.M. (1998b). Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110alpha catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. *Mol. Cell Biol.* 18, 1379-1387.

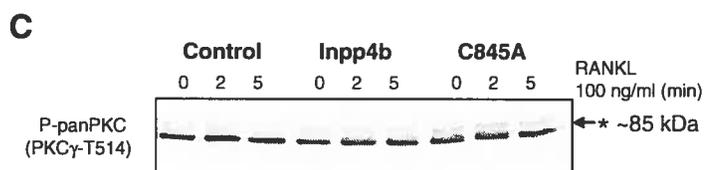
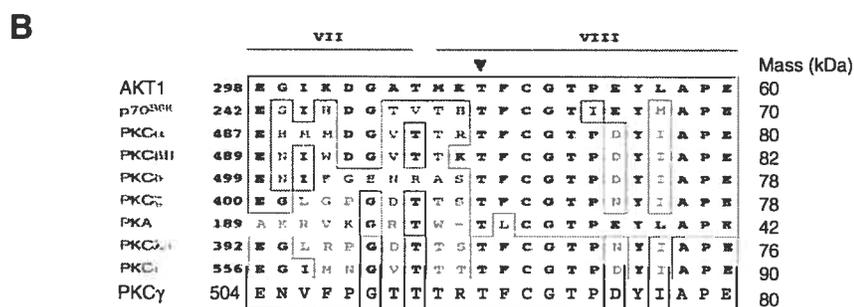
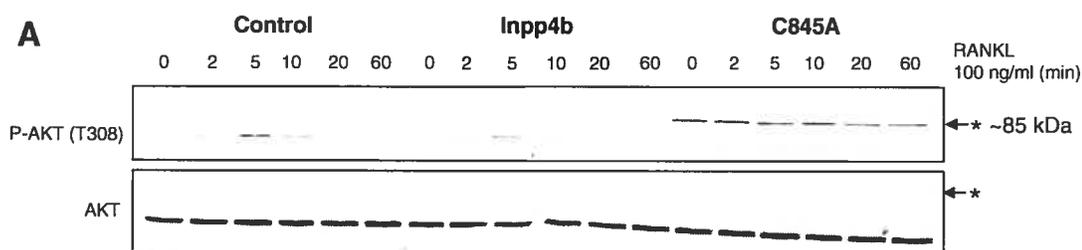
Zauli,G., Rimondi,E., Nicolin,V., Melloni,E., Celeghini,C., and Secchiero,P. (2004). TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) blocks osteoclastic differentiation induced by RANKL plus M-CSF. *Blood* *104*, 2044-2050.

Zhang,X., Hartz,P.A., Philip,E., Racusen,L.C., and Majerus,P.W. (1998). Cell lines from kidney proximal tubules of a patient with Lowe syndrome lack OCRL inositol polyphosphate 5-phosphatase and accumulate phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* *273*, 1574-1582.

Zhang,X., Loijens,J.C., Boronenkov,I.V., Parker,G.J., Norris,F.A., Chen,J., Thum,O., Prestwich,G.D., Majerus,P.W., and Anderson,R.A. (1997). Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase isozymes catalyze the synthesis of 3-phosphate-containing phosphatidylinositol signaling molecules. *J. Biol. Chem.* *272*, 17756-17761.

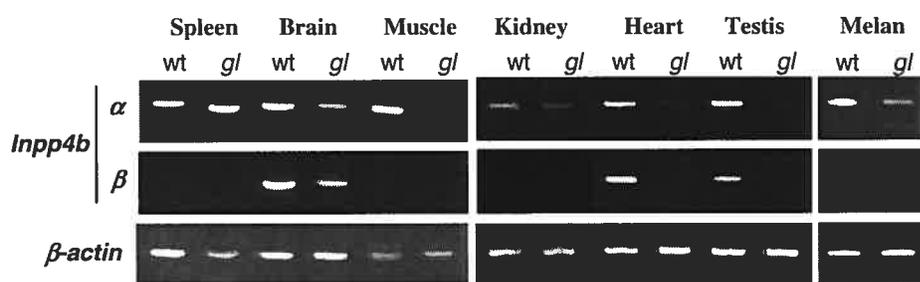
Zhang,Z.Y. and Dixon,J.E. (1994). Protein tyrosine phosphatases: mechanism of catalysis and substrate specificity. *Adv. Enzymol. Relat Areas Mol. Biol.* *68*, 1-36.

Zhao,M., Harris,S.E., Horn,D., Geng,Z., Nishimura,R., Mundy,G.R., and Chen,D. (2002). Bone morphogenetic protein receptor signaling is necessary for normal murine postnatal bone formation. *J. Cell Biol.* *157*, 1049-1060.



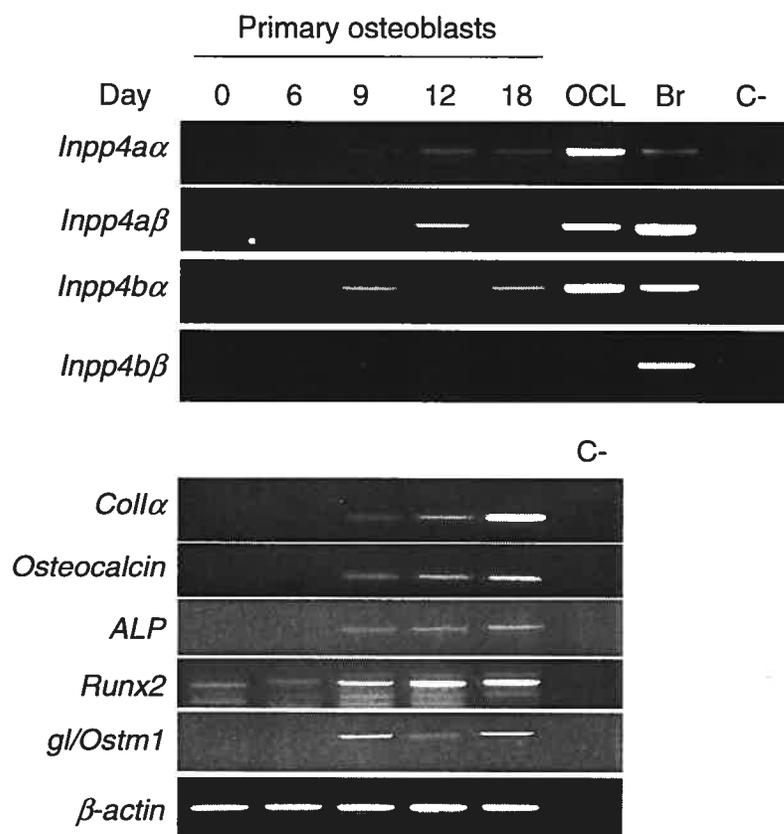
### Annexe 1. Un isoforme de PKC est constitutivement phosphorylé en présence de Inpp4b(C845A).

**A)** L'anticorps phospho-spécifique (Cell Signaling, #4056) dirigé contre la T308 de AKT détecte une autre bande à ~85 kDa (\*) dans les cellules surexprimant le mutant Inpp4b(C845A). Cette bande n'est pas détectée par l'anticorps dirigé (Cell Signaling, #9272) contre un autre épitope non phosphorylé d'AKT (\*). **B)** Alignement de l'épitope contenant la thréonine 308 de AKT (flèche) avec l'épitope correspondant des autres membres de la famille des kinases AGC. La masse moléculaire prédite pour chacune de ces protéines est indiquée à droite (Mass kDa). **C)** Un anticorps dirigé contre la T514 de PKC $\gamma$  et reconnaissant la thréonine correspondante dans toutes les isoformes de PKC (Cell Signaling, #9379), reconnaît une bande à ~85 kDa lorsque le mutant Inpp4b(C845A) est surexprimé.



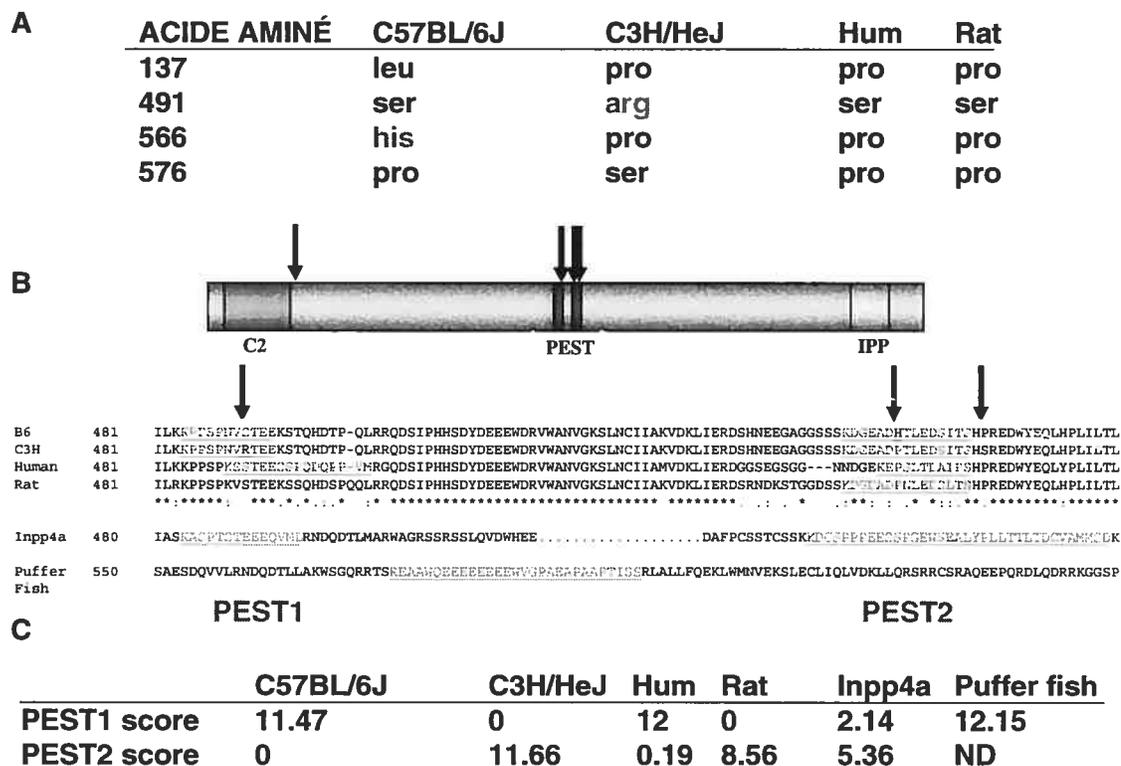
**Annexe 2. Expression différentielle d'*Inpp4b* $\alpha$  et  $\beta$  dans les tissus de souris sauvage (WT) et homozygote *gl/gl* (*gl*).**

Les ARN totaux extraits de tissus ou de cultures de mélanocytes immortalisés (Melan) provenant de souris *+/+* (WT) ou *gl/gl* ont été soumis à une réaction de transcription inverse (RT). L'expression des isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  a été déterminée par PCR en utilisant les oligonucléotides spécifiques décrits au chapitre 2. Le gène  $\beta$ -actin a été utilisé comme contrôle interne. Spleen : rate; Brain : cerveau; Muscle : muscle squelettique; Kidney : rein; Heart : cœur; Testis : testicule.



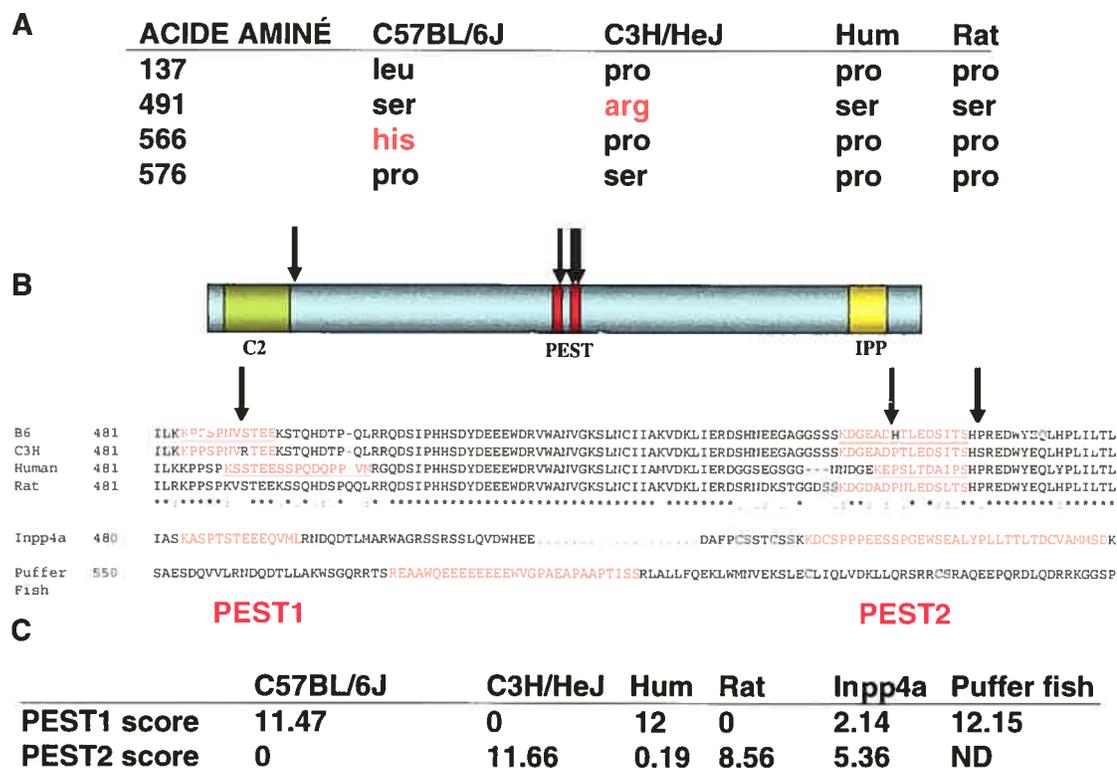
### Annexe 3. Expression différentielle d'*Inpp4a* et d'*Inpp4b* dans les ostéoblastes et les ostéoclastes.

Des ostéoblastes primaires isolés de calvaria de souris nouveaux-nés ont été en présence de  $\beta$ -glycérophosphate et d'acide ascorbique de 0 à 18 jours afin d'induire la différenciation. L'expression des quatre isoformes d'*Inpp4* (*Inpp4aα*, *Inpp4aβ*, *Inpp4bα* et *Inpp4bβ*) a été étudiée par RT-PCR (en haut). L'expression de marqueurs de la différenciation des ostéoblastes et de OSTM1 a également été vérifiée sur les mêmes cellules (en bas). OCL, ostéoclastes; Br, brain (cerveau); C-, contrôle négatif de RT-PCR; Col $\alpha$ , collagen alpha; ALP, phosphatase alcaline.



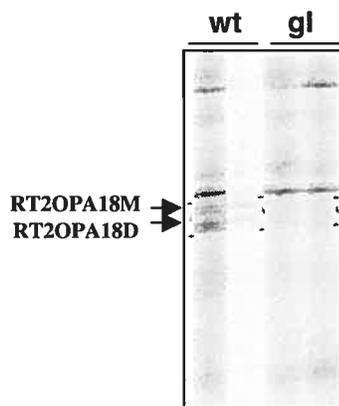
**Annexe 4. Présence de quatre variants dans la séquence protéique d’Inpp4b entre les souches C3H/HeJ et C57BL/6.**

**A.** Le séquençage des ADNc d’Inpp4b de la souche C57BL/6 (B6) et de la souche C3H/HeJ a révélé quatre polymorphismes au niveau de la séquence en acides aminés (Tableau en haut). **B.** Les flèches indiquent la localisation de ces polymorphismes dans différentes régions de la protéine. C2, domaine C2; PEST, région PEST; IPP, site actif inositol polyphosphate phosphatase. Les trois polymorphismes présents au niveau de la région PEST sont indiqués par des flèches au dessus de la séquence protéique de cette région. Les séquences PEST consensus sont indiquées en rouge. **C.** Le tableau indique les scores des séquences PEST1 et 2 chez les souches B6 et C3H, chez l’humain, le rat, dans la protéine Inpp4a de souris et dans Inpp4 du « Puffer fish » *Tetraodon nigroviridis*. Les scores ont été déterminé avec le logiciel PESTfind (<https://embl.bcc.univie.ac.at/toolbox/pestfind/pestfind-analysis-webtool.htm>).



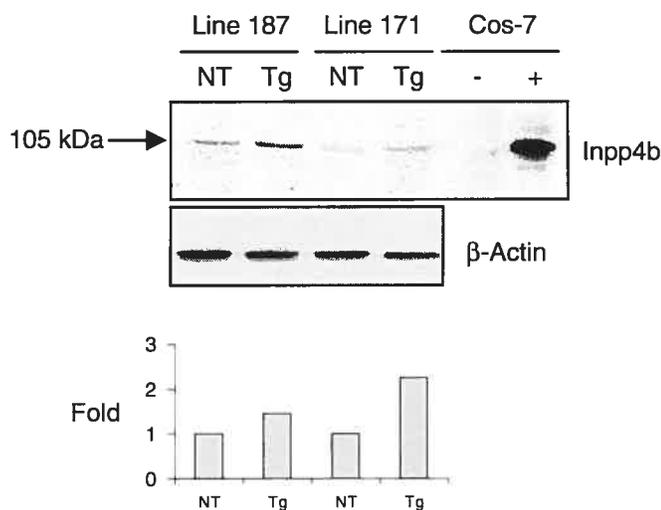
#### Annexe 4. Présence de quatre variants dans la séquence protéique d'Inpp4b entre les souches C3H/HeJ et C57BL/6.

**A.** Le séquençage des ADNc d'Inpp4b de la souche C57BL/6 (B6) et de la souche C3H/HeJ a révélé quatre polymorphismes au niveau de la séquence en acides aminés (Tableau en haut). **B.** Les flèches indiquent la localisation de ces polymorphismes dans différentes régions de la protéine. C2, domaine C2; PEST, région PEST; IPP, site actif inositol polyphosphate phosphatase. Les trois polymorphismes présents au niveau de la région PEST sont indiqués par des flèches au dessus de la séquence protéique de cette région. Les séquences PEST consensus sont indiquées en rouge. **C.** Le tableau indique les scores des séquences PEST1 et 2 chez les souches B6 et C3H, chez l'humain, le rat, dans la protéine Inpp4a de souris et dans Inpp4 du « Puffer fish » *Tetraodon nigroviridis*. Les scores ont été déterminé avec le logiciel PESTfind (<https://embl.bcc.univie.ac.at/toolbox/pestfind/pestfind-analysis-webtool.htm>).



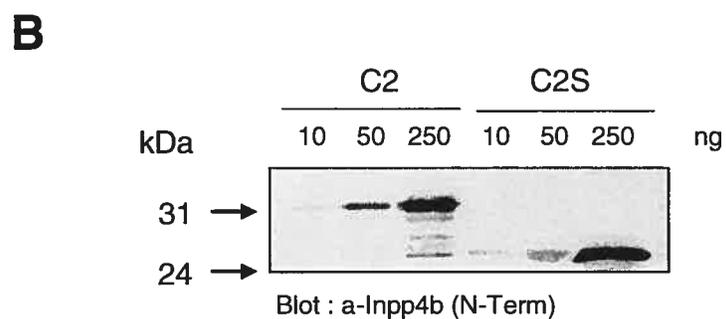
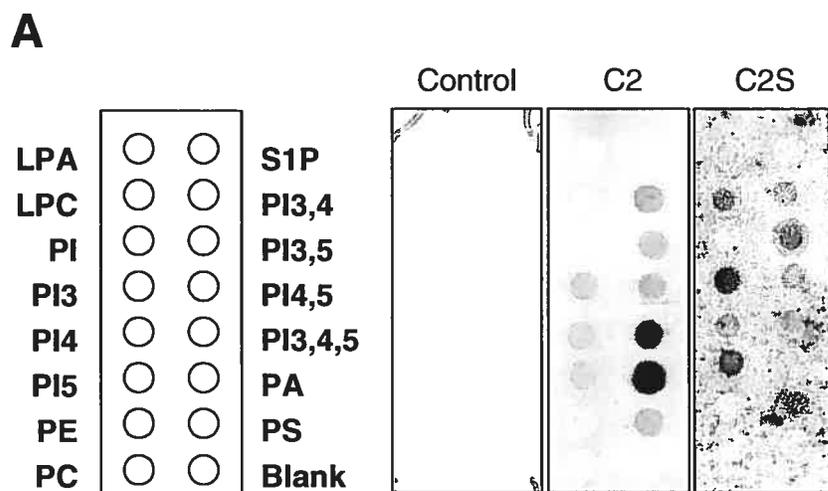
#### Annexe 5. Differential display result that lead to *Inpp4b* identification.

Differential display of splenocyte pre-osteoclast mRNA from +/+ (wt) and osteopetrotic grey-lethal (gl) mice. The amplified PCR radiolabelled products from two independent reactions were resolved on a denaturing acrylamide gel. Two products were isolated according to differential intensity for future characterization. RT2OPA18M and RT2OPA18D (*Glas-1*) represent the same product with one bp difference. This product sequence was founded to be part of one of the mouse *Inpp4b* mRNA.



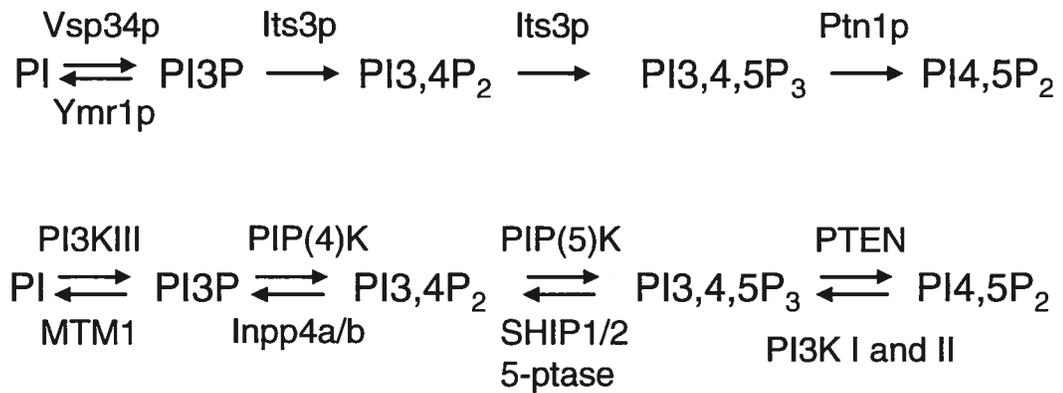
#### Annexe 6. *Inpp4b* protein expression in Trap-*Inpp4b* transgenic OCL.

Proteins extracts from splenocytes derived OCLs of non transgenic (NT) and transgenic (Tg) littermates from two different transgenic lines (187 and 171) were analyzed for *Inpp4b* expression using our polyclonal antibody. Cos-7 cell extracts transfected (+) or not (-) with *Inpp4b*α were used as control. The blot was reprobated with an anti-β-Actin antibody to normalize loading. The fold increased in protein expression was quantified and presented on the graphic.



**Annexe 7. Liaison aux phospholipides des domaines C2 des isoformes Inpp4ba (C2) et Inpp4bas (C2S).**

**A)** Hybridation des domaines C2 et C2S avec des membranes contenant divers lipides (voir chapitre 3 pour la méthode). **B)** Immunobuvardage avec différentes quantités de chacun des deux domaines C2 recombinants démontrant qu'ils sont tous deux reconnus par l'anticorps dirigé contre la partie N-terminale de Inpp4b.



**Annexe 8. Synthèse et dégradation du PI(3,4,5)P<sub>3</sub> chez les levures (haut) et chez les mammifères.**

```

          Beta 1
synIII(A) : 1  AGAPC-GRISFA-LRYLYGSD
              A A   I F + +
Inpp4b    :19  AQANDPEDIQFTSIQIPNEP

          Beta 2          Beta 3          Beta 4   Beta 5
synIII(A) :21  QL VVRILQALDLPKDSNGFSDPYVKIYLLPDRKKK----FQTKVHRKTLNPIF--NETF 74
              QL  IL  DL A S+  + V+I ++  ++          T++  T +P+F  TF
Inpp4b    :40  QLEF-ILACRDLVAPVSDRKLNTVVQISVIHPVEQTLTRYSSSTEIVEGTDPLFLTGVTF 98

          Beta 6          Beta 7          Beta 8
synIII(A) :75  QFSVPLAELAQRKLFHSVYDFDRFSRHDLIQVVLNLELAEQPPDRPLWRDILEGGSE 134
              P+ E  + ++  +VYD   S HD I  VL  E  + PP+  + R  L  G
Inpp4b    :99  PPDYPIYE--ETRIKLTVYDVKDKS-HDTIRTSVLP---EHKDPPE--VARSFL--GCA 148

```

**Annexe 9. Alignement du domaine C2 d'Inpp4b avec le domaine C2A de la synaptotagmine III [synIII(A)].**

Les huit feuillets beta constituant le motif de « clé grec » sont indiqués au dessus de la séquence protéique. Les résidus d'acide aspartique, normalement impliqués dans la liaison aux ions  $Ca^{2+}$  dans les boucles 1 et 3, sont ombragés.