



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III (UT3 Paul Sabatier)

Discipline ou spécialité : Physiologie Cellulaire Intégrée - Physiopathologie

Présentée et soutenue le 19 juillet 2012 par

Ronan BARRÉ

Titre

ÉTUDE DU RÔLE DES RÉCEPTEURS COUPLÉS AUX PROTÉINES G
LORS DE LA DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE DES OSTÉOBLASTES :
INTÉRÊT DE LA VOIE Gi.

École doctorale : Biologie, Santé, Biotechnologies (BSB)

Unité de recherche : INSERM UMR 1043, CPTP

Directeurs de thèse : Pr Jean-Pierre SALLES, Dr Isabelle GENNERO

Rapporteurs

Gérard MAUCO, Professeur à l'Université de Poitiers
Caroline SILVE, Directrice de Recherche INSERM U986
Henri TENENBAUM, Professeur à l'Université de Strasbourg

Membres du jury

Hugues CHAP, Professeur à l'Université de Toulouse
Isabelle GENNERO, Maître de conférence à l'Université de Toulouse
Rachel REYNAUD, Maître de conférence à l'Université de Marseille
Jean-Pierre SALLES, Professeur à l'Université de Toulouse
Caroline SILVE, Directrice de Recherche INSERM U986
Henri TENENBAUM, Professeur à l'Université de Strasbourg

À Adeline.

« C'est une grande sagesse que de
savoir être fou à propos. »

D. Erasme, *L'éloge de la folie*

REMERCIEMENTS

Monsieur le Professeur Hugues Chap, *vous étiez déjà là pour orienter mon cursus de recherche à son origine et je suis particulièrement sensible à l'honneur que vous me faites de présider ce jury. J'ai apprécié votre enthousiasme et votre dynamisme en tant qu'Enseignant comme en tant que Chercheur. Soyez assuré de ma plus respectueuse considération.*

Monsieur le Professeur Gérard Mauco, *je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté de juger ce travail. Soyez assuré de mon profond respect.*

Madame le Docteur Rachel Reynaud, *vous avez accepté de vous intéresser à mon travail avec gentillesse et intelligence. Pour votre participation bienveillante à ce jury, je vous exprime mes très sincères remerciements.*

Madame le Docteur Caroline Silve, *vous m'avez fait le grand bonheur d'être rapporteur de mon travail, veuillez accepter mes plus vifs remerciements pour votre disponibilité et pour votre rigueur constructive lors de nos discussions.*

Monsieur le Professeur Henri Tenenbaum, *je suis très touché de l'honneur que vous me faites en évaluant mon travail. Votre expérience de Chercheur et Clinicien en Parodontologie est pour moi une référence, veuillez trouver ici l'expression de ma plus sincère gratitude pour votre présence à ce jury.*

Monsieur le Professeur Jean-Pierre Salles, *veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance. Vous m'avez guidé tout au long de mon cursus de recherche malgré les obstacles ; la valeur de vos conseils et votre expérience m'ont permis d'aboutir. Puisse ce travail être le reflet de mon immense gratitude.*

Madame le Docteur Isabelle Gennero, *qui a accepté de diriger cette thèse. Pour votre disponibilité, votre gentillesse, votre écoute et vos conseils, nous vous adressons nos plus sincères remerciements. J'espère que ce travail est à la hauteur de la confiance que vous m'avez accordé.*

Ce travail n'existerait pas sans mes autres Maîtres de Recherche (*par ordre d'apparition*) :

Pr Brunel, Pr Duffaut, Dr Gassama et sans leurs équipes respectives bien sûr, notamment Sara Dalicieux, Jacky Rue, Philippe Kémoun, Nicolas Beton...

Enfin, je remercie mon Épouse, mes Parents et mes Amis pour leur soutien durant ces 4 années.

TABLE DES MATIÈRES

ÉTUDE DU RÔLE DES RÉCEPTEURS COUPLÉS AUX PROTÉINES G LORS DE LA DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE DES OSTÉOBLASTES: INTERET DE LA VOIE GI.

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	6
ABRÉVIATIONS	7
RÉSUMÉ	9
INTRODUCTION	11

CHAPITRE I 13

REVUE DE LA LITTÉRATURE :

LA DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE DES OSTÉOBLASTES

I. Ostéogénèse et origine des ostéoblastes	14
II. Différenciation des ostéoblastes	17
III. Marqueurs de la différenciation ostéoblastique	20
IV. Régulation de la différenciation par les RCPGs	26
4.1 RÉCEPTEUR DE LA PTH.....	30
4.2 RÉCEPTEUR DE LA SÉROTONINE	32
4.3 RÉCEPTEUR DE LA MÉLATONINE	34
4.4 RÉCEPTEUR DU LPA	38
V. La Ghreline.....	41
5.1 GÉNÉRALITÉS.....	41
5.2 RÉCEPTEUR	45
5.3 FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES	49

CHAPITRE II 67

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

I. Travaux préliminaires : Intérêt du LPA pour la cicatrisation de défauts osseux de taille critique chez le rat 68

1.1 OBJECTIFS..... 68

1.2 MATERIEL ET METHODES..... 68

1.3 RESULTATS..... 70

1.4 DISCUSSION ET PERSPECTIVES 73

II. La Ghreline différencie les ostéoblastes humains via la voie de signalisation Gi / AMPc..... 75

2.1 OBJECTIFS..... 75

2.2 PUBLICATION..... 76

CONCLUSION 105

BIBLIOGRAPHIE 108

ANNEXES 117

Impact of Calcium Phosphate Particle Morphology on Osteoconduction: an *in vivo* study..... 118

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

FIGURES

Figure 1 : Coupe d'une tête fémorale de souris montrant la plaque de croissance	15
Figure 2 : Représentation de la différenciation de cellules souches multipotentes.....	18
Figure 3 : Étapes successives de la différenciation ostéoblastique.....	19
Figure 4 : Expression de marqueurs de la différenciation ostéoblastique.	25
Figure 5 : Signalisation intracellulaire suivant l'activation du récepteur PTH1R.	31
Figure 6 : Signalisation intracellulaire suivant l'activation du récepteur LPA1.	40
Figure 7 : Structure du gène humain de la ghreline	43
Figure 8 : Structure du gène du récepteur de la ghreline.....	46
Figure 9 : Protocole chirurgical.....	70
Figure 10 : Coupe de site témoin à J15.....	70
Figure 11 : Coupe des sites expérimentaux à J15.....	71
Figure 12 : Berges de sites expérimental et témoin à J15	71
Figure 13 : Coupes de sites expérimental et témoin à J30	72
Figure 14 : Coupes de sites expérimental et témoin à J60	72

TABLEAUX

Tableau 1 : Les principales sous unités des protéines G et leur effecteur primaire	27
Tableau 2 : Exemples de récepteurs couplés à plusieurs protéines G.....	28
Tableau 3 : Actions de la ghreline sur le tissu osseux dans les études <i>in vitro</i>	65

ABRÉVIATIONS

AC :	Adenylate cyclase ou Adenylcyclase
AIS :	Adolescent Idiopathic Scoliosis
AMPc :	Adenosine monophosphate cyclique
ATX :	Autotaxine
BMP :	Bone Morphogenetic Protein
BSP :	Bone Sialoprotein
Coll I :	Collagène de type I
CRE :	Cyclic AMP Response Element
DMEM :	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FGF :	Fibroblast Growth Factor
FSK :	Forskoline
GH :	Growth Hormone
GHRH :	Growth Hormone Releasing Hormone
GHS-R1a :	Growth Hormone Secretagogues Receptor 1a
GMPc :	GMP cyclique
GPCR :	G Protein Coupled receptor
IGF1 :	Insulin-like growth factor 1
IL :	Interleukine
IRS-1 :	Insulin receptor substrate-1
LPA :	Lysophosphatidic Acid
LPC :	Lysophosphatidyl Choline
Lrp5 :	Lipoprotein related peptide 5
MAPK :	mitogen-activated protein kinases
MMP13 :	matrix metalloproteinase 13
MyoD :	Myogenic differentiation antigen
OC :	Osteocalcin
Osx :	Ostérix
PI3K :	Phosphatidyl Inositol 3 Kinase
PKA :	Protéine Kinase A
PKC :	Protéine Kinase C
PLA :	Phospholipase A

PLC:	Phospholipase C
PTHrp :	Parathyroïde Hormone related protein
RCPG :	Récepteur couplé aux protéines G
Runx2 :	Runt-related transcription factor 2
Sox-9 :	SRY (sex determining region Y) -box 9
TGFβ :	Transforming growth factors β
TNFα :	Tumor Necrosis Factor α

RÉSUMÉ

ÉTUDE DU RÔLE DES RÉCEPTEURS COUPLÉS AUX PROTÉINES G LORS DE LA DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE DES OSTÉOBLASTES : INTÉRÊT DE LA VOIE G_i.

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont connus pour être mitogènes ou différenciant pour de nombreux types cellulaires. Ils agissent via différentes voies de signalisation intracellulaires telles que G_s ou G_i, régulant la production d'AMPc par l'adénylcyclase. Ces voies sont particulièrement importantes au cours de la différenciation cellulaire des ostéoblastes. Ainsi, la voie G_s est connue pour induire une prolifération des préostéoblastes en stimulant la production d'AMPc intracellulaire. Nos travaux ont porté sur ces voies de signalisation lors de la différenciation cellulaire des ostéoblastes et plus particulièrement la voie G_i activée par le LPA (acide lysophosphatidique) ou la Ghreline, nouvelle hormone impliquée dans le contrôle du métabolisme et de l'ostéogénèse.

Nous avons d'abord étudié *in vivo* l'intérêt du LPA, activant la voie G_i, dans la cicatrisation de défauts osseux de taille critique pratiqués sur des rats. Les résultats hétérogènes de cette étude préliminaire ne permettent pas de prouver un effet du LPA sur la cicatrisation osseuse, mais justifieraient une expérimentation plus poussée.

Notre approche *in vitro* évalue l'effet de la Ghreline sur la différenciation de lignées cellulaires ostéoblastiques humaines, les MG63 et les SaOs, décrites précédemment comme des cellules respectivement préostéoblastiques et ostéoblastiques. Nous montrons que la Ghreline stimule la minéralisation et l'activité phosphatase alcaline des cellules ostéoblastiques différenciées uniquement. De plus, elle inhibe la production d'AMPc de ces mêmes cellules. Cet effet inhibiteur de la Ghreline sur la production d'AMPc est annulé par PTX, un inhibiteur de G_i, ou par GHRP6 [D-Lys], un inhibiteur de GHS-R1a. Enfin, la Ghreline augmente l'expression du récepteur GHS-R1a.

Nos résultats montrent que sur les ostéoblastes matures, la Ghreline active une voie G_i/AMPc dépendante de son récepteur GHS-R1a et que celle-ci permet la différenciation terminale des ostéoblastes. Cela souligne le rôle potentiel de la Ghreline et du GHS-R1a dans la régulation de la formation osseuse et introduit l'idée que cette hormone agit différemment sur son récepteur selon le stade de différenciation des ostéoblastes.

En conclusion, nos résultats indiquent que la voie G_i a une importance majeure pour la différenciation terminale des ostéoblastes.

MOTS CLÉS : Ostéoblastes, Différenciation, RCPG, Ghreline.

ABSTRACT

STUDY OF THE ROLE OF G PROTEIN COUPLED RECEPTORS IN OSTEOBLASTS CELL DIFFERENTIATION: INTEREST OF THE Gi PATHWAY.

The G protein-coupled receptors (GPCRs) are known to be mitogenic or inducing differentiation for many cell types. They act via different intracellular signaling pathways such as Gs or Gi, which regulate cAMP production by adenylyclase. These pathways are particularly important during cell differentiation of osteoblasts. Thus, the Gs pathway is known to induce proliferation of preosteoblasts by stimulating the production of intracellular cAMP. Our work has focused on the involvement of these signaling pathways during cell differentiation of osteoblasts and especially the Gi pathway activated by LPA (lysophosphatidic acid) or ghrelin, a new hormone involved in the control of metabolism and osteogenesis.

We first investigated *in vivo* the interest of the LPA, activating the Gi pathway, in the healing of critical size bone defects performed on rats. The mixed results of this preliminary study does not prove an effect of LPA on bone healing, but warrant further experimentation.

Our *in vitro* approach studies the effect of ghrelin on the differentiation of human osteoblastic cell lines, the MG63 and Saos, previously described as preosteoblastic and osteoblastic cells, respectively. We show that ghrelin stimulates mineralization and alkaline phosphatase activity of differentiated osteoblastic cells only. It also inhibits the production of cAMP in these cells. This inhibitory effect of ghrelin on cAMP production is canceled by PTX, a Gi inhibitor, or by GHRP6 [D-Lys], an inhibitor of GHS-R1a. Ghrelin also increases GHS-R1a expression.

Our results show that of the mature osteoblasts, ghrelin activates a Gi/cAMP pathway dependent of its receptor GHS-R1a and the latter allows the terminal differentiation of osteoblasts. This highlights the potential role of ghrelin and GHS-R1a in the regulation of bone formation and introduces the idea that this hormone acts differently on its receptor at different stages of osteoblast differentiation.

In conclusion, our results suggest that the Gi pathway is of major importance for the terminal differentiation of osteoblasts.

KEY WORDS: Osteoblast, Differentiation, GPCR, Ghrelin.

INTRODUCTION

Le tissu osseux est le tissu de soutien majeur, que l'on considère le corps humain en son ensemble ou simplement l'organe dentaire. La connaissance des processus physiologiques qui dirigent son développement et sa cicatrisation a des applications pour toute la médecine, y compris la médecine bucco-dentaire et plus particulièrement la chirurgie parodontale. Mes premiers travaux de recherche dans le laboratoire, en collaboration avec la faculté d'Odontologie de Toulouse, ont ainsi porté sur la cicatrisation osseuse. Les expérimentations auxquelles j'ai participé consistaient à évaluer l'intérêt de biomatériaux pour la cicatrisation de défauts osseux de taille critique pratiqués sur la calvaria de rats. Ces travaux ont donné lieu à une publication (signée en deuxième auteur) ici en annexe.

Sur ce modèle expérimental, j'ai ensuite étudié l'apport d'un facteur de croissance particulier, l'acide lysophosphatidique (LPA), agissant au niveau cellulaire via des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont connus pour être des récepteurs mitogènes ou inducteurs de la différenciation de nombreux types cellulaires. Ils agissent via plusieurs voies de signalisation intracellulaires : Gs active l'adénylate cyclase et augmente ainsi la formation d'AMPc intracellulaire, Gi induit l'inhibition de l'adénylate cyclase, Gq est impliqué dans la réponse calcique et $G_{12/13}$ dans l'activation de petites protéines G. Ces voies d'activation sont importantes au cours de la différenciation cellulaire en général et plus particulièrement celle des ostéoblastes. Dans le tissu osseux, il a été montré que le LPA a une action de type Gi. Le LPA a été et reste très étudié dans notre laboratoire où il a fait l'objet de plusieurs publications montrant son implication dans la physiopathologie du tissu osseux. Dans ce contexte, il semblait intéressant d'évaluer *in vivo* l'influence du LPA sur la cicatrisation osseuse et un protocole d'étude préliminaire sur 12 rats a été mis au point. Après avoir participé aux manipulations expérimentales, j'ai réalisé l'analyse histologique des sites opérés. Les résultats de cette expérimentation préliminaire étaient peu conclusifs, mais justifiaient d'aller plus loin.

Dans le même temps, l'équipe d'Endocrinologie Pédiatrique de l'Hôpital des Enfants de Toulouse, avec laquelle notre laboratoire est étroitement lié, a mis en évidence un lien chez des patients atteints des différents syndromes et maladies (Syndrome de Prader-Willi et Scoliose Idiopathique notamment) entre des désordres osseux et une hormone encore mal connue, agissant elle aussi au niveau cellulaire via un RCPG, la ghreline. J'ai donc cherché à préciser l'action de la ghreline sur le tissu osseux, mais cette fois au niveau cellulaire, en étudiant son rôle dans la différenciation de l'ostéoblaste. Pour cela, j'ai utilisé deux lignées cellulaires issues d'ostéosarcomes humains, les MG63 et les SaOs. Grâce à ces cellules, j'ai pu évaluer l'action de la ghreline à différents stades de différenciation ostéoblastique. Mes résultats montrent que la ghreline a une action proliférante sur le préostéoblaste et différenciante sur l'ostéoblaste mature. De plus, j'ai pu préciser l'action de la ghreline sur son récepteur. Ces résultats introduisent l'existence du « switch » de l'effet intracellulaire de la ghreline, passant d'un effet de type Gs sur les préostéoblastes à un effet Gi sur les ostéoblastes matures.

Le premier chapitre de cette thèse présente les mécanismes de la différenciation cellulaire ostéoblastique et les connaissances actuelles sur la régulation de cette différenciation par les RCPG. Une attention particulière a été portée à la présentation de la ghreline et de ses effets connus sur le tissu osseux.

Dans le second chapitre sont exposés mes résultats expérimentaux. Tout d'abord l'étude *in vivo* de l'intérêt du LPA, activant la voie Gi, dans la cicatrisation de défauts osseux de taille critique pratiqués sur des rats. Ensuite, notre approche *in vitro* étudiant l'effet de la Ghreline sur la différenciation de lignées cellulaires ostéoblastiques, les MG63 et les SaOs.

CHAPITRE I

REVUE DE LA LITTÉRATURE : LA DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE DES OSTÉOBLASTES

Les processus cellulaires et moléculaires qui contrôlent la différenciation et la fonction de l'ostéoblaste sont encore peu connus. L'identification de ces processus intéresse les chercheurs et les cliniciens qui sont à la recherche de stratégies thérapeutiques capables de moduler l'ostéoformation, notamment contre les maladies osseuses.

I. Ostéogenèse et origine des ostéoblastes

À 6 mois de gestation, le squelette du fœtus est entièrement composé de membranes fibreuses et de cartilage hyalin. À partir de cette période, le tissu osseux commence à se développer et à remplacer les tissus existants. Deux types d'ossification coexistent alors dans la squelettogenèse humaine (Marie 2001).

L'ossification membranaire, au niveau des os plats, procède d'une apposition directe de matrice ostéoïde. Au sein du mésenchyme embryonnaire, des cellules se condensent sous l'influence de différents facteurs de croissance puis se différencient en ostéoblastes. Ceux-ci sécrètent alors une matrice extra cellulaire riche en collagènes I et III, puis la minéralisent pour engendrer l'os primaire desmal.

L'ossification endochondrale, responsable de la formation des os longs, est caractérisée par le dépôt de matrice osseuse sur une matrice cartilagineuse préexistante. À l'origine, lors de la vie fœtale, des cellules mésenchymateuses se différencient en chondrocytes sous l'influence d'un programme génétique dirigé notamment par le facteur de transcription Sox9. Ces chondrocytes arrondis sécrètent une matrice extra cellulaire riche en collagène de type II. Les chondrocytes du centre de la pièce cartilagineuse vont arrêter leur prolifération et augmenter de volume par un apport en eau pour devenir des chondrocytes hypertrophiques. Ces derniers modifient leur programme génétique pour synthétiser du collagène de type X et exercer un rôle important de régulation. Ils favorisent notamment la différenciation des cellules adjacentes au périchondre en ostéoblastes qui vont sécréter une matrice constituant un manchon osseux périphérique, le futur

os cortical. Par la suite, les chondrocytes hypertrophiques meurent par apoptose et dans leur chondroplastes laissées vides, des capillaires sanguins progressent et permettent l'arrivée des ostéoblastes dérivés de cellules mésenchymateuses pluripotentes. Ceux-ci élaborent alors au centre du cartilage la spongiosa primaire, matrice osseuse ébauche de l'os trabéculaire.

Parallèlement, des chondrocytes continuent de proliférer de part et d'autre du centre du cartilage, allongeant ainsi le futur os. Ils forment des colonnes de chondrocytes avec une orientation nette guidant l'allongement de l'os selon un seul axe. Aux extrémités de l'os, des centres d'ossification secondaire apparaissent. Au terme de la vie foetale, c'est à partir d'une zone cartilagineuse située à chaque extrémité des os longs, sous ces centres d'ossification secondaire, que va se produire l'allongement des os jusqu'à la fin de l'adolescence. Cette zone est appelée « plaque de croissance » et elle s'organise en différentes couches cellulaires successives (Figure 1).

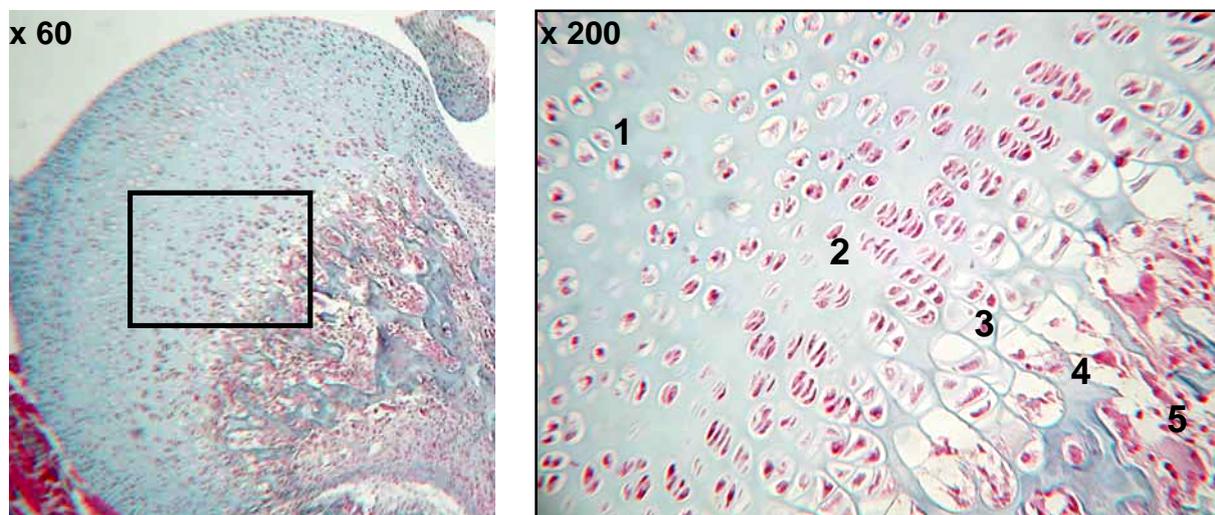


Figure 1. Coupe histologique d'une tête fémorale de souris montrant la plaque de croissance fémorale, colorée au trichrome de Masson.

1. Zone de réserve, 2. Zone proliférative, 3. Zone hypertrophique, 4. Zone d'invasion vasculaire, 5. Spongiosa primaire (Images de l'auteur non publiées - Laboratoire de Biologie Buccale, Faculté de Chirurgie Dentaire de Toulouse).

Au sommet de la plaque de croissance, juste sous l'épiphyse, la première couche est formée de chondrocytes arrondis possédant un potentiel de prolifération très faible. C'est la zone de réserve, aussi appelée zone de repos ou zone quiescente. Y font suite des chondrocytes plus aplatis et dotés d'une forte capacité de prolifération, organisés en colonnes le long du grand axe de l'os. Ils constituent la zone proliférative. Puis en s'éloignant progressivement de l'épiphyse, les chondrocytes vont changer de phénotype. Ils s'hypertrophient tant en largeur qu'en hauteur et synthétisent du collagène de type X. C'est la zone hypertrophique. Par les mêmes mécanismes que ceux décrits plus haut, la matrice cartilagineuse et les chondrocytes à ce niveau vont progressivement être remplacés par le tissu osseux (Kronenberg 2003).

Ainsi, la croissance des os longs dépend de la prolifération et de l'hypertrophie des chondrocytes nouvellement formés. Dans l'espèce humaine, le mécanisme de passage du stade de prolifération au stade de dégénérescence par apoptose du chondrocyte dure environ 20 jours. Les dates d'ossification sont assez constantes d'un individu à l'autre, mais elles varient d'un os à l'autre. À la fin de la période de croissance, le cartilage de croissance devient moins épais, étant progressivement remplacé par du tissu osseux. Il finit par disparaître, l'épiphyse et la diaphyse se réunissant par un processus appelé synostose. À la suite de cette fusion, aucune croissance en longueur de l'os ne peut plus s'effectuer.

Une fois le processus de modelage de la pièce osseuse terminé démarre le processus de remodelage du tissu osseux non lamellaire en tissu osseux lamellaire mature. Ce remodelage existe toute la vie. Il est effectué par des unités de remodelage osseux asynchrones et se déroule en plusieurs phases. Il y a d'abord une phase d'activation de l'unité de remodelage, puis une phase de résorption de la matrice osseuse par des ostéoclastes, suivie d'une phase d'inversion et enfin d'une phase d'ostéoformation par des ostéoblastes. Ce remodelage est donc le fruit d'une étroite coopération entre les ostéoclastes et les ostéoblastes.

Les processus cellulaires et moléculaires impliqués dans les deux types d'ossification, membranaire et endochondrale, ne sont cependant pas fondamentalement différents. Ainsi, pour les os longs, les ostéoblastes proviennent de la différenciation de cellules souches du stroma médullaire et pour les os plats, les ostéoblastes proviennent de la différenciation de cellules souches mésenchymateuses dérivées de la crête neurale. Puis, dans les deux cas, le renouvellement des ostéoblastes tout au long de la vie se fait ensuite à partir de cellules souches mésenchymateuses médullaires (Marie 2001).

II. Différenciation des ostéoblastes

À l'origine, les cellules mésenchymateuses ont une grande plasticité et peuvent se différencier en chondroblastes, ostéoblastes, myoblastes ou adipocytes sous l'induction de facteurs locaux et systémiques. La différenciation vers l'une ou l'autre voie implique l'expression temporelle de facteurs de transcription, dont certains sont identifiés (Figure 2). L'expression de MyoD induit la voie myoblastique et celle du peroxisome PPAR γ 2 (proliferator activated receptor γ 2) induit la différenciation adipocytaire. L'expression de Sox-9 induit la voie ostéochondroblastique alors que celle de Runx2 est nécessaire plus spécifiquement pour la différenciation ostéoblastique. L'expression de ces facteurs module la plasticité cellulaire (Marie 2001, Karsenty 2008).

L'ostéogenèse est ainsi caractérisée par l'engagement et la prolifération de cellules ostéoprogénitrices qui se différencient progressivement en ostéoblastes fonctionnels chargés de la synthèse et de la minéralisation de la matrice osseuse au cours de la croissance du squelette (modelage), du renouvellement de la matrice osseuse chez l'adulte (remodelage) et de la réparation osseuse tout au long de la vie (Marie 2001).

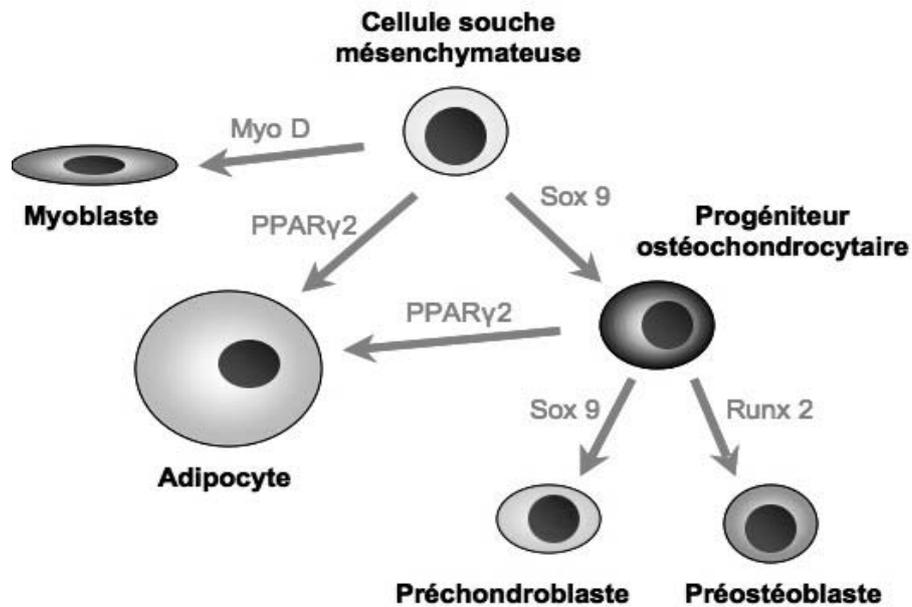


Figure 2. La différenciation de cellules souches multipotentes. La différenciation vers un type cellulaire dépend de l'expression de facteurs de transcription spécifiques (Modifié d'après Marie 2001 et Karsenty 2008).

L'apparition d'ostéoblastes matures est l'aboutissement d'un processus étroitement régulé en plusieurs étapes. Le progéniteur ostéochondrocytaire doit d'abord se différencier en ostéoprogéniteur engagé, puis en préostéoblaste, puis en ostéoblaste jeune et enfin en ostéoblaste mature (Figure 3). Ensuite, *in vivo*, les ostéoblastes matures ont trois devenir possibles. Soit ils disparaissent par apoptose, soit ils deviennent des ostéocytes enfermés dans la matrice osseuse, soit ils deviennent des cellules quiescentes bordant la surface de la pièce osseuse.

Selon leur stade de développement, les cellules de la lignée ostéoblastique présenteront des propriétés différentes et n'exprimeront qu'une partie du phénotype ostéoblastique (Katsogiannis & Ng 2004). Ces étapes de différenciation successives, théoriquement réversibles, sont concomitantes d'une diminution de la fonction de prolifération et sont dépendantes de la bonne coordination d'une large séquence d'événements intra et extra-cellulaires (Tang *et al.* 2008). Cela comprend l'action de facteurs de différenciation, mais également la mise en place d'un environnement de la cellule propice à la production de tissu osseux (Drouet, Barré *et al.* 2008).

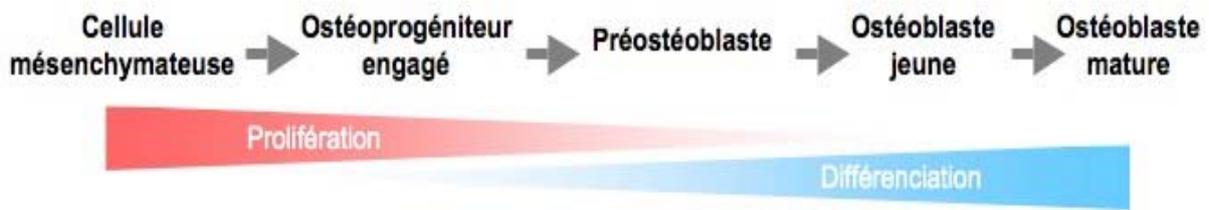


Figure 3. Étapes successives de la différenciation ostéoblastique.

Les facteurs régulant la détermination successive de ces types cellulaires sont encore mal connus. Cela est notamment dû au mode de production du tissu osseux qui fait intervenir simultanément tous les différents types cellulaires ostéoblastiques au sein des unités de remodelage osseux. Il est donc impossible d'isoler *in vivo* ou sur des prélèvements tissulaires des ostéoblastes à des stades de différenciation différents afin de les caractériser. Le développement de modèles de cultures de cellules de lignées ostéoblastiques murines et humaines a donc facilité l'étude de la différenciation ostéoblastique.

Parmi ces modèles de culture cellulaire osseuse, certains dérivent de cultures primaires de cellules osseuses immortalisées (de souris : MC3T3-E1, de rat : UMR 201 par exemple) et d'autres sont issus de tumeurs osseuses (murines : ROS 17/2.8 et UMR 106 ou humaines : MG-63, SaOS-2 ou plus récemment OS1 (Pereira *et al.* 2009)). Ces lignées cellulaires ont des comportements et des phénotypes différents en culture, car elles représentent des étapes de différenciation ostéoblastique différentes. Ainsi, MG63, MC3T3-E1 et UMR 201 sont des cellules qui ont été décrites comme représentatives d'un stade préostéoblastique alors que ROS 17/2.8 et SaOs-2 ont un profil phénotypique d'ostéoblaste mature (Kartsogiannis & Ng 2008, Shapira & Halabi 2009). Les expérimentations menées *in vitro* sur ces modèles ont permis d'identifier les grandes étapes du programme de différenciation de l'ostéoblaste et ont mis en évidence une flexibilité considérable dans le répertoire de gènes ostéogéniques exprimés au cours des multiples stades de différenciation (Marie 2001, Blair *et al.* 2002).

Ainsi, en fonction de la chronologie d'expression de ces gènes, des marqueurs de la différenciation ostéoblastique ont été définis.

III. Marqueurs de la différenciation ostéoblastique

La fonction principale de l'ostéoblaste étant de synthétiser et de minéraliser la matrice osseuse, les cellules de la lignée ostéoblastique acquièrent des propriétés correspondant à la mise en place étape par étape de leur fonction. Les modèles de culture cellulaire osseuse, placés dans des conditions adéquates, subissent *in vitro* des changements phénotypiques mimant les étapes de la différenciation ostéoblastique *in vivo* et culminant en la formation de nodules de minéralisation. Cela a permis de donner un aperçu de la régulation progressive de l'expression génique des cellules de la lignée ostéoblastique. Les observations faites à partir de ces systèmes ont été extrapolées à l'os adulte *in vivo* et ont contribué à développer les concepts du phénotype ostéoblastique (Kartsogiannis & Ng 2008).

Au cours de chacun des stades de différenciation sont observées des variations séquentielles caractéristiques des gènes associés à l'activité proliférative et le cycle cellulaire d'abord, puis des gènes associés aux activités spécifiques des ostéoblastes. Ce sont soit des marqueurs précoces de type facteur de transcription comme Runx2, soit des marqueurs phénotypiques fonctionnels comme la phosphatase alcaline par exemple. Outre l'expression de composants de la matrice, le processus de différenciation osseuse est également déterminé par l'expression temporelle de certaines hormones (PTH notamment) et cytokines. Par exemple, l'expression du récepteur à la PTH apparaît être corrélée avec l'avancée de la différenciation (Kartsogiannis & Ng 2008).

Lors de la première phase, la prolifération active est reflétée par une activité mitotique avec l'expression de gènes associés au cycle cellulaire (histone H4 notamment) et à la croissance cellulaire (protooncogènes : *c-myc*, *c-fos* et *c-jun*). Une fois la phase de prolifération majeure passée

et lorsque la différenciation est entamée, des facteurs de transcription plus spécifiques des ostéoblastes apparaissent. Certains gènes, associés à la formation de la matrice extra cellulaire, sont également exprimés activement pendant cette phase, puis graduellement down-régulés pendant les premiers stades de différenciation ostéoblastique (collagène de type I et TGF- β).

Ainsi, l'ARNm du **collagène I** est transcrit mais pas traduit dans un premier temps, puis il est exprimé pleinement par la suite, car la sécrétion de cette protéine constitue la base de la matrice extra cellulaire osseuse (environ 10 % de la masse osseuse). Il fait partie des marqueurs précoces spécifiques de la lignée ostéoblastique (Kartsogiannis & Ng 2008, Blair *et al.* 2002).

Les **TGF- β** sont des facteurs locaux fondamentaux dans le contrôle de l'ostéogenèse. Ils sont principalement produits par les ostéoblastes fonctionnels et stockés dans la matrice osseuse. *In vivo*, le TGF- β stimule fortement la formation osseuse chez le rat. *In vitro*, le TGF- β stimule la prolifération des préostéoblastes ainsi que la production de collagène de type I et de l'ostéopontine. En outre, le TGF- β a un effet anti-apoptotique sur les ostéoblastes (Marie 2001). Les protéines morphogénétiques osseuses ou **BMP** (BMP-2, 4, 6 et 7), membres de la famille du TGF- β , sont produites par les ostéoblastes et jouent un rôle fondamental dans le contrôle de la formation osseuse. Elles aussi sont exprimées d'abord précocement dans la lignée ostéoblastique, puis tardivement lors de la phase de minéralisation. Les BMP agissent à plusieurs étapes, en augmentant l'expression de Runx2 dans les précurseurs ostéoblastiques et en stimulant l'expression des gènes ostéoblastiques (phosphatase alcaline, collagène de type I, ostéocalcine) dans les ostéoblastes. Contrairement aux autres BMP, la BMP-3 inhibe la différenciation des cellules ostéoprogénitrices induite par la BMP-2, et l'inactivation du gène codant augmente la masse osseuse chez la souris (Daluiski *et al.* 2001, Kémoun *et al.* 2007).

Runx2, également dénommé Cbfa1, est un facteur de transcription multifonctionnel de poids moléculaire 55kDa qui contrôle le développement squelettique en régulant l'expression de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire ainsi que la différenciation des chondrocytes et des ostéoblastes. Il joue un rôle majeur pour la différenciation tardive des chondrocytes et leur maturation en régulant l'expression du collagène X, de l'ostéopontine, de la sialoprotéine osseuse (BSP) et de MMP13 dans les chondrocytes hypertrophiques terminaux (Komori 2010).

Pendant la différenciation ostéoblastique, Runx2 augmente l'expression des gènes de protéines de la matrice osseuse dont le collagène I, l'ostéopontine, la BSP, l'ostéocalcine et la fibronectine. Il est essentiel à la détermination des cellules mésenchymateuses pluripotentes vers la lignée ostéoblastique. Cependant, la surexpression de Runx2 inhibe la maturation des ostéoblastes et réduit l'expression du collagène I et de l'ostéocalcine. Pendant le développement osseux, Runx2 augmente le nombre d'ostéoblastes immatures et induit la différenciation ostéoblastique ce qui permet la formation de l'os primaire. Son niveau d'expression doit ensuite être diminué pour permettre l'acquisition par les ostéoblastes du phénotype nécessaire à la formation d'os mature (Komori 2010).

D'autre part, l'expression de Runx2 est nécessaire à la différenciation précoce des odontoblastes, puis est inhibée lors de la dentinogénèse. Runx2 empêche la différenciation terminale des odontoblastes et peut même induire une transdifférenciation des odontoblastes en ostéoblastes.

En résumé, Runx2 stimule l'expression des gènes majeurs de la matrice osseuse pendant les stades précoces de la différenciation ostéoblastique, il n'est pas essentiel ensuite au maintien de l'expression de ces gènes dans les ostéoblastes matures (Komori 2010).

Ostérix (Osx) est un facteur de transcription protéique de poids moléculaire de 46kDa lié à un atome de zinc. Son expression est dépendante de celle de Runx2 et il agit en aval de celui-ci dans les préostéoblastes. Il est spécifiquement exprimé dans le tissu osseux en développement et est indispensable à la formation osseuse. En effet, les souris KO sur ostérix ont un squelette

harmonieux mais uniquement composé de cartilage, malgré l'expression normale de Runx2. Ostérix complète donc l'action de Runx2 sur les précurseurs ostéochondroblastiques en déterminant l'orientation ostéoblastique pure (Nakashima *et al.* 2002).

Dans le même temps, immédiatement après la limitation de la prolifération, des protéines associées au phénotype ostéoblastique peuvent être détectées, tel que la phosphatase alcaline.

La **phosphatase alcaline** (PAL) est une protéine enzymatique ectocellulaire ancrée à la membrane plasmique. Elle est exprimée notamment à la membrane des chondrocytes hypertrophiques, des ostéoblastes et des odontoblastes. La PAL est capable d'hydrolyser des esters monophosphates à pH élevé (pH 8-10) pour produire le substrat de la formation d'hydroxyapatite en diminuant en plus la quantité de ces esters qui sont des inhibiteurs de la formation d'hydroxyapatite. Cela est donc à l'origine du phénomène de la minéralisation (Orimo 2010). Plus les cellules osseuses progressent vers la phase de minéralisation, plus elles expriment la phosphatase alcaline (Kartsogiannis & Ng 2008).

L'expression d'autres gènes comme celui de l'ostéopontine, la sialoprotéine osseuse (BSP) et l'ostéocalcine est induite plus tardivement, lors de la mise en place de la minéralisation.

L'**ostéopontine** est une phosphoprotéine non-collagénique qui peut avoir une masse moléculaire de 25 à 75 kDa selon les phosphorylations, glycosylations et les nombreux clivages protéiques possibles. Elle n'est pas spécifique du tissu osseux et est exprimée notamment par des cellules nerveuses, rénales et placentaires. Son expression dans le tissu osseux dépend de Runx2 (Haylock & Nilsson 2006). Elle est d'abord exprimée pendant la période de prolifération active (à 25% des niveaux maximaux), puis décroît en phase post-proliférative, pour être induite ensuite à des niveaux maximaux au début de la minéralisation. Ces pics tardifs d'expression d'ostéopontine peuvent trouver leur explication dans les propriétés de liaison au calcium de cette

protéine acide (Kartsogiannis & Ng 2008). En effet, elle peut se lier à la fibronectine, au collagène de la matrice extracellulaire et au calcium et participe à la modulation de la minéralisation et de la résorption osseuse. En outre, l'ostéopontine interagit avec des récepteurs de nombreux types cellulaires et favorise ainsi l'adhésion et la motilité cellulaire notamment (Haylock & Nilsson 2006).

La **sialoprotéine osseuse (BSP)** est une protéine non-collagénique majeure des tissus conjonctifs minéralisés dont le gène fait partie de la famille des glycoprotéines SIBLING (Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein). À ce titre, elle est impliquée dans la régulation de la formation de cristaux d'hydroxyapatite dans les os et les dents. Elle est donc exprimée par les ostéoblastes matures et elle est utilisée couramment comme un marqueur tardif de la différenciation ostéogénique (Zhang *et al.* 2009).

L'**ostéocalcine** est une protéine vitamine K-dépendante exprimée spécifiquement en phase post-proliférative par les ostéoblastes matures, au début de la formation de nodules de minéralisation. Cette expression tardive dans la séquence de différenciation ostéoblastique en fait un marqueur de l'ostéoblaste mature, d'autant plus qu'elle a un rôle possible lors du couplage de la résorption et de la formation osseuse (Kartsogiannis & Ng 2008). En effet, l'ostéocalcine se lie à l'hydroxyapatite et est stockée dans la matrice osseuse. Quand elle est relarguée dans la circulation sanguine, c'est un marqueur du renouvellement osseux. Cependant, le fait que la souris KO sur l'ostéocalcine présente un phénotype à haute masse osseuse donne à penser que l'ostéocalcine est normalement un inhibiteur de la formation osseuse. De plus, c'est une hormone qui augmente la production et la sensibilité à l'insuline, favorisant l'utilisation du glucose et la dépense d'énergie. Cela a mis en évidence les liens existant entre le tissu osseux et le métabolisme énergétique en général, ce qui a été confirmé avec d'autres hormones non spécifiques de l'os, mais ayant un effet sur la masse osseuse, comme la leptine par exemple (Fukumoto & Martin 2009, Clarke 2008).

Tous ces marqueurs sont utilisés expérimentalement pour caractériser le stade de différenciation des cellules de la lignée ostéoblastique (Figure 4).

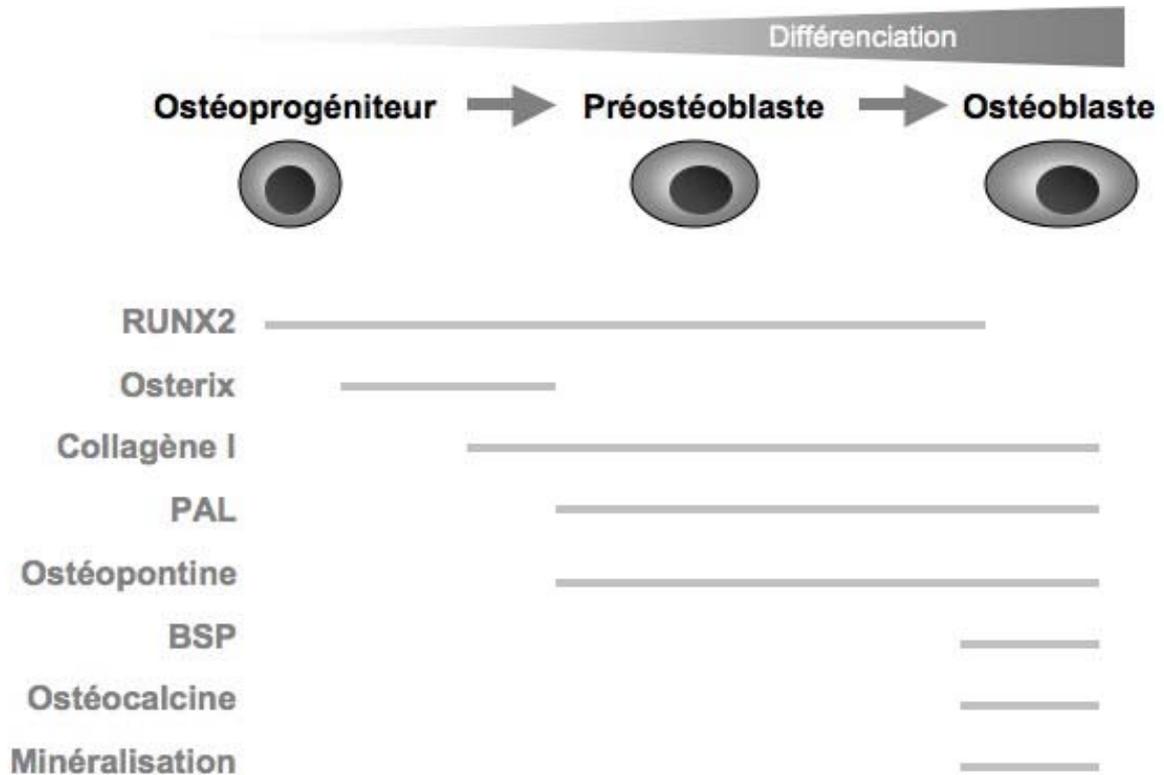


Figure 4. Expression de marqueurs de la différenciation ostéoblastique (Modifié d'après Marie 2001).

La connaissance de l'expression de ces marqueurs a permis d'étudier l'effet de nombreux composés sur la différenciation ostéoblastique et nous nous intéresserons plus particulièrement aux récepteurs couplés aux protéines G.

IV. Régulation de la différenciation par les RCPGs

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) constituent une des plus grandes superfamilles de protéines membranaires. Plus de 800 RCPG distincts sont présents dans le génome humain et leurs gènes représentent jusqu'à 1% du génome des mammifères. Ils sont présents à la surface de toutes les cellules des organismes multicellulaires. Les RCPG jouent un rôle primordial pour la communication intercellulaire et pour la transduction des signaux extracellulaires à travers la membrane cellulaire via les protéines liant la guanine (protéines G) avec une grande sensibilité et une grande spécificité (Li *et al.* 2010, Premont & Gainetdinov 2007, Hermans 2003).

Les RCPGs sont également nommés « récepteurs à sept domaines transmembranaires » en raison de leur configuration caractéristique comprenant sept domaines hydrophobes (hélices- α) traversant la membrane plasmique. Ces domaines sont séparés par des boucles intra et extracellulaires. Bien que cette structure générale soit conservée entre les RCPGs, les homologies de séquence entre récepteurs distincts sont le plus souvent réduites aux domaines transmembranaires. La spécificité du récepteur pour son ligand est liée au site de reconnaissance extracellulaire constitué par la portion NH₂ terminale, les boucles extracellulaires et la poche formée à la surface de la membrane plasmique par les sept hélices assemblées. Les interactions avec les partenaires intracellulaires (protéines G notamment) impliquent la portion COOH terminale et les boucles intracellulaires (Hermans 2003).

Le mécanisme de la transduction du signal est le suivant : la liaison d'un agoniste au récepteur altère sa configuration globale, ce qui engendre des changements dans les domaines intracellulaires. Ces changements permettent l'association spécifique du récepteur avec différentes protéines G hétérotrimériques. Celles-ci sont composées d'une sous-unité α interagissant avec un complexe $\beta\gamma$. Il s'en suit l'échange d'une molécule de GDP avec une molécule de GTP dans le site actif de la sous unité α , permettant alors la dissociation du complexe hétérotrimérique et

laissant les protéines G interagir avec d'autres effecteurs intracellulaires ou membranaires. L'activité GTPase intrinsèque de la sous-unité α restaure ensuite une conformation inactive et l'affinité pour le complexe $\beta\gamma$ (Hermans 2003).

La complexité et la spécificité de la signalisation par les RCPGs est due à l'existence de nombreux types de sous-unités de protéines G. Ainsi, les différentes sous unités α sont codées à partir d'au moins 17 gènes différents. Ces sous-unités sont classées en 4 familles : $G\alpha_i$, $G\alpha_s$, $G\alpha_q$ et $G\alpha_{12}$. Par rapport à la variété de RCPGs et de protéines G, le nombre d'effecteurs est assez limité et beaucoup de protéines G sont couplées avec le même effecteur intracellulaire (Tableau 1).

Tableau 1. Les principales sous unités des protéines G et leur effecteur primaire

Sous unité	Famille	Effecteur primaire
α	$G\alpha_s$	Adénylate cyclase \uparrow
	$G\alpha_i$	Adénylate cyclase \downarrow
	$G\alpha_q$	Phospholipase C \uparrow
β		Adénylate cyclase \uparrow/\downarrow
		Phospholipases \uparrow
		PI3K \uparrow
γ		PKC \uparrow
		PKD \uparrow
		Canaux Ca^{2+} \uparrow

(Adapté de Hermans 2003)

De plus, il a été mis en évidence un couplage des protéines G pour différents récepteurs dans différents tissus. Dans certains cas, un récepteur unique peut activer simultanément 3 ou 4 classes de protéines G (G_s , G_i , G_q et G_{12}) (Tableau 2). La plupart des RCPGs interagissent simultanément avec différentes protéines G distinctes et ainsi, à partir de la stimulation d'un seul récepteur, plusieurs effecteurs intracellulaires peuvent être activés.

Tableau 2. Exemples de récepteurs couplés à plusieurs protéines G

Récepteur	Gs	Gi	Gq	Référence
GnRH	X	X	X	Stanislaus <i>et al.</i> 1998
Mélatonine		X	X	Brydon <i>et al.</i> 1999
PTH	X		X	Offermanns <i>et al.</i> 1996
Sérotonine (5-HT _{2C})		X	X	Cussac <i>et al.</i> 2002

(Adapté de Hermans 2003)

Les différents RCPG peuvent répondre à des hormones, des neurotransmetteurs, des chémokines, des signaux odorants ou sapides. Ils régulent de nombreux processus physicochimiques basiques par le réseau de signalisation cellulaire comme la vision, le goût, l'odorat, le métabolisme, la neurotransmission, la différenciation cellulaire, la croissance, l'inflammation ou encore la réponse immunitaire. Pour toutes ces raisons, les RCPG sont les cibles pharmacologiques les plus importantes à l'heure actuelle : 30% des médicaments disponibles sur le marché agissent via les RCPG (Li *et al.* 2010, Premont & Gainetdinov 2007).

Dans le tissu osseux, les RCPG sont largement exprimés et répondent à de nombreux stimuli physiologiques comme des facteurs de croissance, des cytokines, des hormones peptidiques (PTH et PTHrp) ou encore la signalisation des ions calciques. Ils sont notamment liés au contrôle de la prolifération cellulaire de l'ostéoblaste via les protéines G et de nombreuses kinases (PKA, PKC, MAPK...) qui régulent activement la progression du cycle cellulaire (Teplyuk *et al.* 2008).

L'activation de la voie Gs a été associée à une stimulation de la formation osseuse alors que la voie Gi induirait une diminution de la formation trabéculaire osseuse (Peng *et al.* 2008). En outre, l'activation de Gq conduirait à une ostéopénie et pourrait désensibiliser les ostéoblastes à la signalisation Gs. Comme certains récepteurs agissent via ces trois voies de signalisation, les voies

Gi et Gq pourraient contre balancer le processus de formation osseuse médié par Gs. Les interactions entre différents RCPGs exprimés dans les ostéoblastes pourraient ainsi expliquer la variabilité phénotypique de ces cellules observée *in vivo* au cours du temps (Hsiao *et al.* 2010).

En 2008, Hsiao *et al.* ont conçu un RCPG synthétique couplé aux protéines Gs et l'ont surexprimé *in vivo* chez des souris sélectivement dans le tissu osseux. Ce modèle permettait d'observer l'effet d'une stimulation de type Gs continue sur le tissu osseux de souris. Ils ont constaté que cette surexpression entraînait une augmentation très importante de la masse osseuse et de tous les marqueurs osseux. Mais ce phénotype n'était pas retrouvé quand ce récepteur n'était exprimé qu'à partir de la 4^{ème} semaine postnatale, ce qui semble montrer que la sensibilité des ostéoblastes aux stimulations de type Gs varie temporellement chez la souris (Hsiao *et al.* 2008).

La même équipe a précisé ces résultats en 2010 en développant un modèle d'expression de leur récepteur inductible à l'aide de doxycycline. Ainsi, ils ont précisé que l'effet stimulant de l'activité Gs continue sur la formation osseuse n'intervient qu'à partir des 4^{ème} et 5^{ème} jours de la croissance post natale, même si leur récepteur est exprimé avant. De plus, plus l'expression de leur récepteur est retardée, moins l'effet stimulant sur la formation osseuse est important. Enfin, si leur récepteur n'est plus exprimé chez la souris adulte, les anomalies osseuses ont tendance à disparaître, indiquant une réversibilité du phénotype induit par la stimulation Gs continue.

Leurs résultats suggèrent donc une variabilité de la sensibilité des ostéoblastes à la stimulation Gs lors du développement, avec un rôle prépondérant de cette voie de signalisation dans la période prépubertaire. Cela est en accord avec l'existence de nombreuses maladies humaines affectant la signalisation des protéines G dans le tissu osseux qui apparaissent dans l'enfance et laissent des séquelles chez l'adulte, comme le syndrome de McCune-Albright par exemple. Ils mettent enfin en avant le rôle global de l'activation continue de la voie Gs sur les changements masse osseuse, plutôt que les propriétés de signalisation spécifiques d'un récepteur en particulier (Hsiao *et al.* 2010).

Nous allons maintenant présenter plus particulièrement certains RCPGs ayant montré une influence importante sur la différenciation osseuse.

4.1 RÉCEPTEUR DE LA PTH

L'hormone parathyroïdienne (PTH) est un médiateur majeur du remodelage osseux et un régulateur essentiel de l'homéostasie calcique. Elle active indirectement les ostéoclastes ce qui augmente la résorption osseuse. Pendant ce processus, la PTH change le phénotype de l'ostéoblaste et d'une cellule faite pour produire du tissu osseux, elle fait une cellule qui dirige la résorption osseuse. Outre ces effets cataboliques, elle a été définie comme un facteur anabolique dans le tissu osseux *in vivo* et *in vitro*. Il est bien établi que l'exposition prolongée à la PTH entraîne une augmentation de la résorption osseuse alors que l'administration intermittente de PTH stimule la formation osseuse. Ainsi, la PTH peut potentiellement être utilisée dans le traitement de l'ostéoporose en administration intermittente. L'augmentation de la masse osseuse observée résulte d'une augmentation du nombre d'ostéoblastes recrutés à partir des cellules bordantes et par prolifération des ostéoblastes. En effet, la PTH peut activer les MAPK et donc stimuler la prolifération des ostéoblastes. De plus, les études *in vitro* et *in vivo* ont montré que la PTH active directement la signalisation de survie chez les ostéoblastes ou encore la résistance à l'apoptose, au moins chez la souris (Swarthout *et al.* 2002, Jilka 2007).

Du point de vue de la signalisation cellulaire, les actions de la PTH et du PTHrP sur l'ostéoblaste sont médiées par un seul récepteur couplé aux protéines G nommé PTH1R. La liaison d'un ligand au PTH1R stimule la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) par l'adenylyl cyclase via des protéines G stimulantes ($G\alpha_s$) couplées au récepteur. Ensuite, l'AMPc se lie à la sous-unité régulatrice de la PKA ce qui libère les sous-unités

catalytiques de l'enzyme. PTH1R stimule également la phospholipase C (PLC) via les protéines $G\alpha_q$ ce qui entraîne la libération de diacyl-glycérol (DAG) activant la PKC, ainsi que la libération d'inositol triphosphate (IP3), ce qui augmente la concentration intracellulaire en calcium libre (Figure 5).

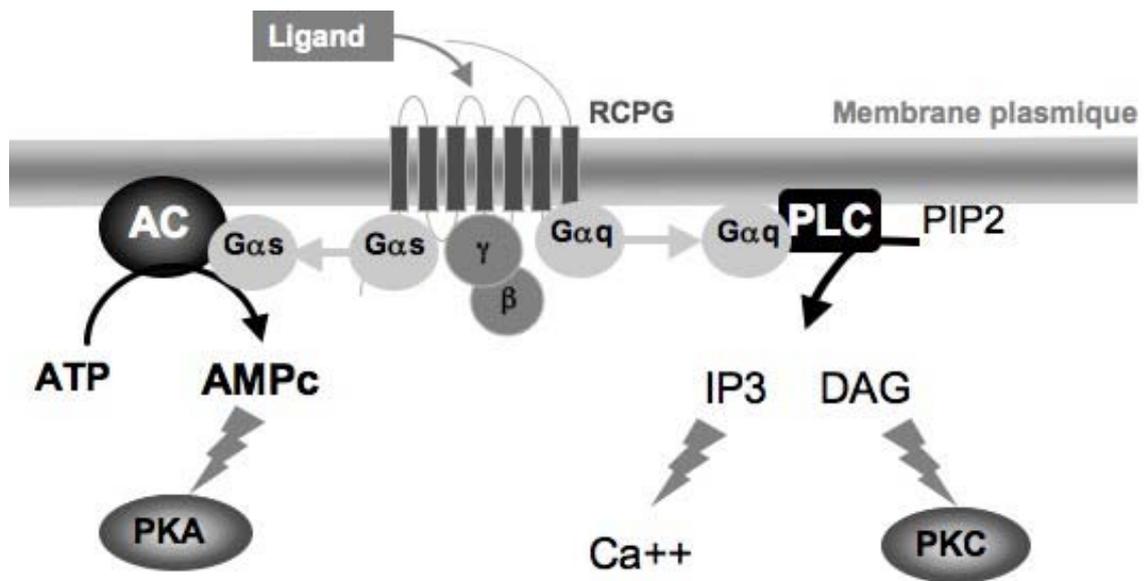


Figure 5. Signalisation intracellulaire suivant l'activation du récepteur PTH1R.

L'activation des ostéoblastes par la PTH résulte en l'expression de gènes favorisant la dégradation de la matrice extracellulaire (collagénase 3), la production de facteurs de croissance (IGF1, TGF- β) et le recrutement des ostéoclastes (RANKL et IL6). La PTH diminue également l'expression de gènes impliqués dans la formation osseuse comme ceux du collagène I, de la phosphatase alcaline, de l'ostéonectine et de l'ostéopontine. La capacité de PTH de diriger des changements dans l'expression des gènes est dépendante de l'activation de facteurs de transcription tels que la famille AP1, RUNX2 et CREB. Et cette régulation dépend principalement de la PKA. La plupart des effets de la PTH peuvent être reproduits avec des analogues de l'AMPc ou avec d'autres activateurs de la PKA, alors que l'activation seule de PKC ne suffit pas (Swarthout *et al.* 2002, Jilka 2007).

Outre les changements dans l'expression des gènes, la PTH peut stimuler la prolifération des ostéoblastes. Le traitement de cellules murines (UMR 106) avec de faibles concentrations de PTH entraîne une augmentation de leur prolifération, via l'activation PTH-dépendante de la PKC qui augmente la signalisation ERK (Swarthout *et al.* 2002, Jilka 2007).

4.2 RÉCEPTEUR DE LA SÉROTONINE

La sérotonine est une bioamine produite dans les neurones cérébraux et dans les cellules entérochromaffines du duodénum. Comme elle ne passe pas la barrière hémato-encéphalique, cette molécule a deux identités fonctionnelles selon son lieu de synthèse. La sérotonine cérébrale est impliquée dans les fonctions cognitives en tant que neurotransmetteur, alors que les fonctions de la sérotonine intestinale, qui représente 95% du total, sont de type hormonale mais restent méconnues. Cette sérotonine intestinale est libérée dans la circulation générale où la majorité est prise en charge par les plaquettes via un transporteur spécifique. Cependant, une petite fraction reste libre dans le sérum et peut agir comme une hormone en se liant aux récepteurs de la sérotonine présents sur les cellules cibles. D'ailleurs, les patients qui prennent chroniquement des inhibiteurs synthétiques de la recapture de la sérotonine (antidépresseurs), une classe de médicaments augmentant la concentration extracellulaire de sérotonine dans tout le corps, peuvent subir une réduction de leur masse osseuse (Yadav *et al.* 2008).

Les ostéoblastes expriment trois récepteurs de la sérotonine : Htr 1b, Htr 2a et Htr 2b. Au niveau de l'hypothalamus, on en compte 14 et c'est le Htr 2c qui est le plus exprimé. Htr 1b est celui qui est responsable des effets de la sérotonine sur les cellules ostéoblastiques d'après les expériences de délétion génique. En effet, s'il manque même un seul des deux allèles du Htr-1b, le nombre d'ostéoblaste augmente ainsi que le taux de formation osseuse et la masse osseuse.

L'inactivation des deux autres types de récepteurs n'affecte pas la masse osseuse (Yadav *et al.* 2008, Yadav *et al.* 2009). Htr-1b est lié à une protéine G α i qui inhibe la production d'AMPc et donc les phosphorylations dépendantes de PKA. C'est le cas de CREB, un facteur largement exprimé et déjà connu pour être impliqué dans la modulation de la prolifération ostéoblastique, qui est l'effecteur principal de la signalisation du récepteur de la sérotonine. La sérotonine, une fois liée au récepteur Htr-1b, inhibe la formation osseuse en contrôlant la prolifération ostéoblastique via la régulation de l'expression de Cycline D1 par CREB. Le contrôle transcriptionnel de la biologie osseuse est décrit classiquement comme dépendant d'acteurs spécifiques à l'ostéoblaste : Runx2 et Ostérix notamment. Pourtant, aucun d'entre eux n'est impliqué dans la signalisation de la sérotonine dans les ostéoblastes. Cela renforce l'idée selon laquelle à côté de facteurs de transcription spécifiques, d'autres facteurs plus largement exprimés peuvent significativement influencer la différenciation et les fonctions de l'ostéoblaste (Yadav *et al.* 2008).

Dans leur dernière étude parue en 2009, Yadav *et al.* introduisent une notion supplémentaire. Selon son site de synthèse, la sérotonine régule de façon opposée la masse osseuse : la sérotonine duodénale l'inhibe, alors que la sérotonine centrale la favorise via les neurones de l'hypothalamus ventro-médial influençant l'activité sympathique. Bien que la sérotonine centrale ne représente que 5% du pool de sérotonine de l'organisme, son influence sur le remodelage osseux est dominante par rapport à celle de la sérotonine intestinale (Yadav *et al.* 2009).

4.3 RÉCEPTEUR DE LA MÉLATONINE

La mélatonine ou N-acétyl-5-méthoxytryptamine est une hormone dont le précurseur est un acide aminé : le tryptophane. Elle est synthétisée très majoritairement dans les pinéaloctes de la glande pinéale (ou épiphyse), petite formation glandulaire appendue au toit du III^{ème} ventricule cérébral, faisant partie de l'épithalamus et dont les fonctions restent mal connues. Il existe d'autres lieux de synthèse mineurs comme la rétine, l'intestin et la moelle osseuse (Macchi & Bruce 2004). La sécrétion de la mélatonine est soumise à des variations nyctémérales importantes et est inhibée par la lumière. Physiologiquement, lorsque la nuit tombe, de la noradrénaline est libérée par les fibres terminales sympathiques, ce qui stimule les récepteurs, entraînant une augmentation de la concentration d'AMP cyclique intracellulaire puis une augmentation de la sécrétion de mélatonine. Elle est très reproductible d'un jour à l'autre chez un même individu mais très variable d'un individu à l'autre ce qui rend difficile l'établissement d'une zone de normalité. On note une diminution progressive de la sécrétion de mélatonine avec l'âge (Macchi & Bruce 2004).

Deux sous-types de récepteurs à la mélatonine ont été identifiés chez l'homme : les récepteurs MT1 et MT2. Les récepteurs MT1 sont présents au niveau du noyau supra chiasmatique de l'hypothalamus qui contrôle la sécrétion rythmique de la mélatonine. MT1 et MT2 sont rencontrés chez l'homme également au niveau du cervelet, des cellules en bâtonnets de la rétine et des ganglions. En dehors du système nerveux central, des récepteurs à la mélatonine ont été isolés sur les lymphocytes et les plaquettes sanguines, les cellules épithéliales de la prostate, les cellules de la granulosa du follicule ovarien, les spermatozoïdes, la muqueuse du colon et des cellules osseuses : ostéoblastes et ostéoclastes (Macchi & Bruce 2004). Ces récepteurs de la mélatonine sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à des protéines G inhibitrices (Gi) dont l'activation conduit notamment à une inhibition de l'adénylate cyclase, enzyme responsable de la synthèse de l'AMPc.

La mélatonine faciliterait le sommeil en provoquant notamment une diminution de la latence d'endormissement, et éventuellement une amélioration de la microstructure du sommeil. Elle contribue à la sensation de fatigue et à la baisse de la vigilance. La mélatonine appartient à la classe des chronobiotiques, c'est-à-dire qu'elle modifie les rythmes dans le sens d'une avance ou d'un retard de phase selon l'heure d'administration. Elle peut être utilisée pour prévenir les effets du décalage horaire. La mélatonine est également hypothermique et hypotensive (Macchi & Bruce 2004).

Le rôle de la mélatonine dans la reproduction a été démontré dans de nombreuses espèces de mammifères. Elle est considérée comme un médiateur essentiel de la reproduction saisonnière dans les espèces photopériodiques. Chez l'homme, le rôle de la mélatonine dans la reproduction n'est pas clair. L'hypothèse d'une association entre le début de la puberté et la baisse de la sécrétion de mélatonine à cet âge a été avancée, mais est discutée. La mélatonine combinée avec des progestatifs de synthèse a un effet contraceptif en empêchant la sécrétion pulsatile de GnRH et donc la survenue du pic de LH, bloquant de fait l'ovulation. Toujours au niveau endocrinien, la mélatonine donnée par voie orale a un effet de stimulation sur la prolactine et la GH (Macchi & Bruce 2004).

La mélatonine exercerait des effets inhibiteurs sur la croissance tumorale cancéreuse ; elle antagoniserait notamment les effets mitogènes des estrogènes. C'est également un antioxydant puissant qui exerce des effets inhibiteurs sur les radicaux libres. Elle stimulerait également l'immunité (Macchi & Bruce 2004).

Enfin, le métabolisme osseux semble être en partie régulé par la mélatonine. La mélatonine stimule la prolifération et la différenciation sur des ostéoblastes humains, ce qui se traduit par une augmentation significative des marqueurs de différenciation osseuse comme la BSP, la phosphatase alcaline et le collagène I. La mélatonine peut diminuer l'activité des ostéoclastes, d'une part en stimulant la sécrétion d'ostéoprotégérine (protéine synthétisée par les ostéoblastes qui inhibe la différenciation des ostéoclastes) et d'autre part en s'opposant pour

partie à la résorption osseuse par ses propriétés antioxydante et anti-radicaux libres (Cardinali *et al.* 2003).

En 2004, l'équipe de Moreau a démontré *in vitro* un dysfonctionnement de signalisation intracellulaire de la mélatonine dans les ostéoblastes en culture de patients atteints de scoliose idiopathique de l'adolescent (SIA) comparativement à des témoins atteints ou non d'un autre type de scoliose (Moreau *et al.* 2004). En effet, chez les témoins, la mélatonine administrée dans le milieu de culture induit normalement une inhibition de l'activité adényl cyclase, stimulée au préalable par un composé synthétique: la forskoline, et cela se traduit par une baisse du taux intracellulaire d'AMPc d'environ 60 à 70 %. En revanche, les ostéoblastes des patients atteints de SIA montrent une absence ou une nette diminution de cette inhibition induite par la mélatonine. Cela est à mettre en rapport avec le fait que l'accumulation d'AMPc dans les ostéoblastes est connue pour empêcher la différenciation ostéoblastique, via la dégradation protéolytique de Runx2 (Tintut *et al.* 1999).

Le contrôle de la phosphorylation de la sous-unité $G_{i\alpha}$ semblant avoir un rôle important dans le défaut de signalisation de la mélatonine, l'équipe de Moreau a ensuite étudié en particulier la protéine PKC δ (protéine kinase C delta), une sérine-thréonine kinase connue pour phosphoryler les protéines G_i et désensibiliser les récepteurs auxquels elles sont couplées. La translocation de la PKC δ à travers la membrane cellulaire nécessite son interaction avec RACK1 (receptor for activated protein C kinase 1), protéine liant uniquement la forme activée de PKC δ . Les tests ont montré des profils d'interaction (MT2/PKC δ et PKC δ /RACK1) différents entre les témoins et 3 groupes de patients atteints de SIA, suggérant que les différents types de réponse observés dépendent bien de changements moléculaires distincts, encore mal connus, au sein de la voie de signalisation de la mélatonine (Azeddine *et al.* 2007).

En 2008, la même équipe de Montréal a avancé une hypothèse concernant l'effet de l'estradiol sur cette voie de signalisation de la mélatonine dans les ostéoblastes de patients atteints de SIA (Letellier *et al.* 2008). Les auteurs avancent la théorie d'une inversion entre la protéine

$G\alpha_i$ et la protéine $G\alpha_s$ qui deviendrait la protéine G majoritairement couplée au récepteur MT. Or, il a été montré que les estrogènes modulent la voie de signalisation des protéines G dans les ostéoblastes. Ajouté aux cultures d'ostéoblastes de souris pendant 48 heures, l'estradiol augmente l'expression de $G\alpha_i$ et $G\alpha_q$ et réduit celle de $G\alpha_s$ alors qu'une stimulation chronique par l'estradiol réduit l'expression de toutes les protéines G ($G\alpha_i$, $G\alpha_s$ et $G\alpha_q$) (Papaionnou *et al.* 1999). Ici, les auteurs montrent qu'avec un traitement court (30 min) par l'estradiol, des ostéoblastes de patient atteint de SIA stimulés par la mélatonine ont des taux intracytoplasmiques d'AMPc significativement abaissés, en comparaison à ceux observés en présence de mélatonine seule. En outre, en réalisant une co-immunoprécipitation à partir d'extraits membranaires d'ostéoblastes, ils démontrent que le couplage du récepteur MT2 à la protéine $G\alpha_s$ est diminué en présence d'estradiol. Ils en concluent que l'estradiol peut favoriser le découplage du récepteur MT2 avec la protéine G_s au profit de G_i , sans en démontrer le mécanisme (Letellier *et al.* 2008). D'après cette théorie, les estrogènes pourraient corriger *in vivo* la voie de signalisation défectueuse de la mélatonine en diminuant la production d'AMPc.

En résumé, une des étiologies possibles de la SIA serait une résistance cellulaire des ostéoblastes à la mélatonine en raison d'un blocage de la voie G_i , peut-être par phosphorylation de résidus sérines au niveau de la sous-unité $G\alpha_i$, ou par un switch entre les protéines G_i et G_s . Ceci provoque un défaut d'inhibition de l'adénylate cyclase et donc un maintien de taux élevé d'AMPc intracellulaire. Or, la production d'AMPc est un élément important de la régulation de l'ostéogenèse comme cela a été montré pour le syndrome Mc Cune Albright notamment. De plus, les examens pratiqués à l'hôpital des enfants de Toulouse sur les sujets souffrant de SIA montrent qu'ils présentent fréquemment une ostéopénie ou en tout cas une densité osseuse basse pour leur âge.

4.4 RÉCEPTEUR DE L'ACIDE LYSOPHOSPHATIDIQUE

L'acide lysophosphatidique (LPA) est le phospholipide le plus simple retrouvé dans la nature. Il est constitué d'un squelette glycérophosphate sur lequel est greffé un acide gras, en position 1 ou 2, par l'intermédiaire d'une liaison acyl, alkyl ou alkényl. Chez les mammifères, les espèces majoritaires de LPA retrouvées dans les liquides biologiques sont constituées d'acides gras à longue chaîne saturée ou insaturée. Ces espèces majoritaires présentent généralement l'activité biologique la plus forte. Le LPA a longtemps été considéré comme un simple intermédiaire transitoire lors de la synthèse des glycérophospholipides. Mais un certain nombre d'études depuis les années 1960 décrivent différentes activités biologiques liées au LPA comme la contraction des cellules musculaires lisses, des effets vasomoteurs ou la migration plaquettaire. Aujourd'hui, le LPA est considéré comme un phospholipide endogène bioactif qui possède toutes les propriétés d'un facteur de croissance et qui joue notamment un rôle dans la prolifération cellulaire, la migration et l'apoptose (Gaits *et al.* 1997, Saulnier-Blache 2004).

Deux voies de synthèse majeures sont décrites. Historiquement, la première voie met en jeu l'association de PLC (phospholipase C) et PLA2 (phospholipase A2). Le diacylglycérol (DAG) produit sous l'effet d'une PLC et rephosphorylé peut être transformé en LPA sous l'effet d'une PLA1 ou d'une PLA2. Un second mécanisme plus récemment identifié paraît prédominant dans beaucoup de contextes paracrines en particulier dans l'adipocyte ou dans les tumeurs. Il met en jeu un type particulier de PLD (phospholipases D) actif sur les lysophospholipides dont la lysophosphatidylcholine (LPC) et appelé : autotaxine (ATX). Ainsi, dans le plasma, la LPC est produite par une LCAT (lecithincholesterol acyltransferase) et des enzymes de type PLA1. Elle est ensuite transformée par l'activité PLD de l'ATX en LPA (Saulnier-Blache 2004). Au niveau du tissu osseux, dans les métastases ostéolytiques, la production de LPA par les plaquettes via l'ATX stimulerait l'ostéoclasie (David *et al.* 2010). Cependant, un mécanisme de production par

l'ostéoblaste lui-même, mettant en jeu une PLA2 et très certainement une PLD, a été identifié (Panupinthu *et al.* 2008). Dans le laboratoire, il a été mis en évidence une production de LPA par les cellules souches mésenchymateuses en milieu ostéogénique. Physiologiquement, lors de l'apoptose massive des ostéoblastes arrivant en différenciation terminale, la PLA2 extracellulaire est très présente au niveau de la matrice osseuse, donc une production mettant en jeu le phénomène de *flip-flop* n'est pas à exclure. Ces données sont importantes car elles peuvent modifier les concentrations de LPA dans les milieux biologiques et ainsi l'activation sélective de certains de ses récepteurs.

Le LPA est maintenu en solution dans les liquides biologiques grâce à sa liaison avec l'albumine qui lui sert de véhicule. En raison de sa nature polaire, sa présence dans les milieux biologiques extracellulaires ne peut résulter que d'une synthèse directement dans le milieu extracellulaire ou d'un transfert actif. Il existe différentes protéines de liaison du LPA (albumine, protéines de liaison des acides gras, gelsoline), mais aucun transporteur transmembranaire n'a été mis en évidence (Saulnier-Blache 2004). Dans le cas de l'albumine, sa liaison au LPA semble être nécessaire à l'effet ostéogénique du LPA (Blackburn & Mansell 2012).

Le LPA agit par l'intermédiaire de récepteurs présents sur les membranes plasmiques. Plusieurs récepteurs couplés aux protéines G (GCPRs) ont été identifiés comme étant spécifiques du LPA : LPA₁, LPA₂, LPA₃, LPA₄, LPA₅ ainsi que 3 autres GCPR récemment mises en évidence GPR87, P2Y5 (LPA₆) et P2Y10 (Noguchi *et al.* 2009).

Les récepteurs LPA₁ et LPA₂ sont largement présents et exprimés au niveau embryonnaire et dans les tissus adultes ainsi que dans de nombreuses lignées cellulaires. Ces deux récepteurs ont la capacité d'activer plusieurs voies de signalisation, sensibles à la pertussis toxine (Gi) ou insensibles (Gq), ayant pour conséquence d'inhiber l'adénylate-cyclase, de mobiliser le calcium intracellulaire et d'activer notamment les voies PI3K et mitogen-activated protein kinase (MAPK) via Ras (Figure 6) (Saulnier-Blache 2004).

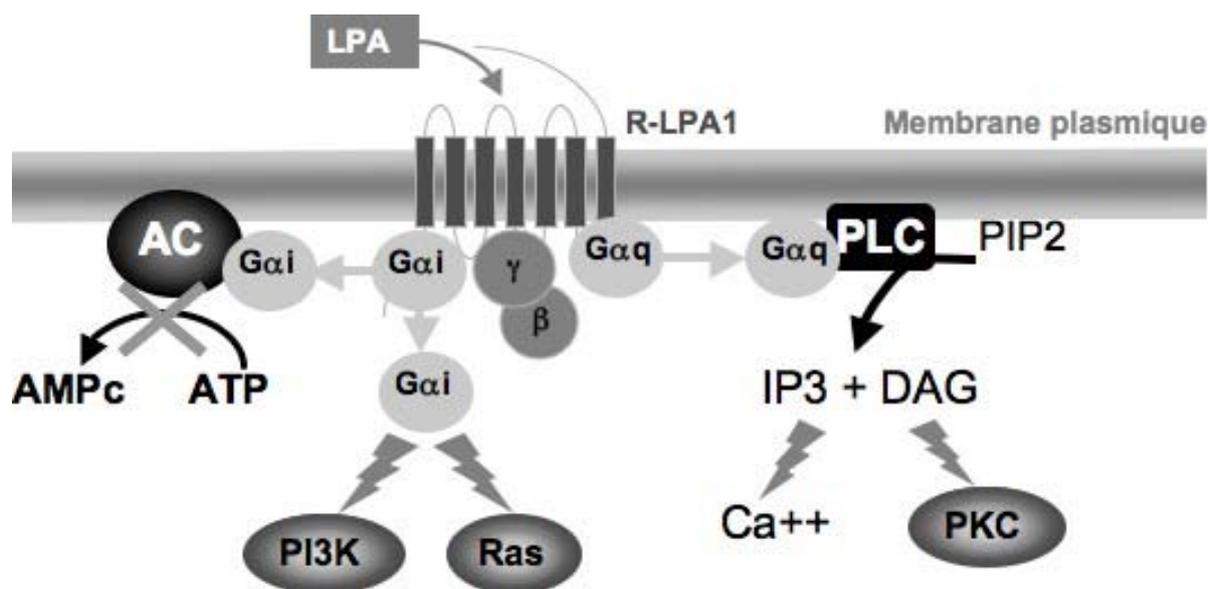


Figure 6. Signalisation intracellulaire suivant l'activation du récepteur LPA1.

A contrario, le récepteur LPA₄ est relativement peu exprimé chez l'Homme en dehors de la période gestationnelle et il a la capacité d'activer la voie Gs (Ishii *et al.* 2009).

D'ailleurs, au niveau du tissu osseux, les récepteurs LPA₁ et LPA₄ sont impliqués de façon opposée dans la régulation de l'ostéogénèse, LPA₁ favorisant l'ostéogénèse alors que LPA₄ l'inhibe (Liu *et al.* 2010). Ainsi, la souris KO sur le récepteur LPA₄ présente un volume osseux augmenté, alors que l'étude de la souris KO sur le récepteur LPA₁ montre une masse osseuse diminuée et des problèmes d'ostéogénèse. De plus, *in vitro*, les cellules souches mésenchymateuses indifférenciées issues de la souris LPA₁^(-/-) présentent une différenciation ostéoblastique moindre (Liu *et al.* 2010 ; Gennero, Laurencin *et al.* 2011).

Enfin, concernant les ostéoclastes, les travaux de l'équipe du Pr Peyruchaud ont clairement montré un effet positif du LPA sur l'ostéoclastogénèse (David *et al.* 2010).

Il semble donc que le LPA influe sur la formation à la fois des ostéoblastes et des ostéoclastes à partir de leurs progéniteurs, ce qui suggère des effets directs du LPA sur le contrôle de la masse et de la composition osseuse (Blackburn & Mansell 2012).

V. La Ghrelina

5.1 GÉNÉRALITÉS

La ghrelina a pour étymologie le préfixe proto-indo-européen « ghre » pour grandir et « relina » en rapport avec les travaux de Bowers *et al.* en 1977 qui rapportaient des effets directs de relargage de GH au niveau de la glande pituitaire par des oligopeptides synthétiques dérivés de la métenképhaline. Ces peptides étaient initialement appelés GH-releasing peptides (GHRPs) puis GH-secretagogues (GHSs) pour inclure des molécules congénériques. Ainsi, de nombreux analogues de la ghrelina ont été développés et décrits fonctionnellement depuis une trentaine d'années, avant que ne soit enfin découverte la ghrelina (Veldhuis & Bowers 2010).

La ghrelina est un peptide acylé de 28 acides aminés qui a été isolé pour la première fois en 1999 (Kojima *et al.* 1999) à partir d'extraits gastriques de rats et ensuite chez l'Homme (Date *et al.* 2000). Kojima *et al.* cherchaient le ligand d'un récepteur orphelin, le GHS-R type 1a (Growth Hormon Secretagogue Receptor) (Howard *et al.* 1996, Korbonits *et al.* 2001), qui stimule la sécrétion d'hormone de croissance au niveau de la glande pituitaire. Ils ont ainsi découvert la ghrelina au niveau gastrique, mais elle a également été identifiée dans l'hypophyse et l'hypothalamus où son récepteur est le plus présent (Gnanapavan *et al.* 2002).

La ghréline circulante, chez l'Homme comme chez le rat, est sécrétée principalement par les cellules X/A-like de l'épithélium gastrique fondique et, en moindre partie, par des cellules X/A-like de l'intestin grêle (Date *et al.* 2000). Elle a été mise en évidence dans beaucoup d'autres sites mineurs comme l'hypothalamus, l'hypophyse, les surrénales, la thyroïde, les poumons, les seins, les ovaires, le placenta, les testicules, la prostate, le foie, le pancréas, le tissu adipeux, les lymphocytes, la rate, les reins, les muscles squelettiques, le myocarde, la peau, le système veineux,

l'os et même la pulpe des dents (Date *et al.* 2000, Gnanapavan *et al.* 2002, Fukushima *et al.* 2005, Delhanty *et al.* 2006, Aydin *et al.* 2007, Ueberberg *et al.* 2009), mais à des taux faibles lui conférant, s'ils existent, des effets probablement autocrines ou paracrines.

Le gène humain de la ghreline est situé sur le chromosome 3p25-26 et comprend 6 exons dont le premier (exon 0) est non codant et fait 20 paires de bases (Seim *et al.* 2007). L'ARNm de la ghreline code pour un précurseur de 117 acides aminés (aa) : la préproghreline, formée d'un peptide signal de 23 aa et d'une séquence de 94 aa : la proghreline. Cette proghreline subit ensuite un clivage pour libérer la ghreline mature, dont la composition en acides aminés chez le rat est la suivante : **GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR**. Chez l'homme, la lysine en position 11 et l'alanine en position 12 sont remplacées respectivement par l'arginine et la valine (Kojima & Kangawa 2005) (Figure 7). De nombreuses études suggèrent que l'extrémité C-terminale restante de la proghreline pourrait circuler dans l'organisme sous forme intacte, appelée « C-ghreline » ou sous forme de produits de clivage. Ainsi, en 2005, un peptide de 23 aa issu de la séquence de la proghreline (53-75) et aminé sur son extrémité C-terminale a été décrit. Comme il semblait avoir des effets antiorexigéniques, il a été baptisé « obestatine » (Zhang *et al.* 2005). L'obestatine a ainsi été présentée comme ayant une action opposée à la ghreline, passant par le récepteur orphelin GPR39, sur des régions cibles comme l'hypothalamus et l'hypophyse. Le gène de la proghreline aurait donc codé pour deux hormones aux actions opposées sur le métabolisme énergétique et cela aurait pu expliquer que la délétion du gène de la ghreline n'affecte pas globalement la croissance et l'appétit. Cependant, des études récentes n'ont pas réussi à reproduire les résultats de Zhang *et al.*, il apparaît donc improbable que l'obestatine soit un peptide endogène ayant une action antagoniste à la ghreline (Pemberton & Richards 2008). D'autres peptides issus du gène de la ghreline ont été synthétisés, mais sans qu'on n'ait pu encore les retrouver dans le plasma humain ou qu'on leur ait attribué de rôle physiologique (des-Gln14-ghréline, peptide $\Delta 3$ COOH-terminal) (Soares & Leite-Moreira 2008).

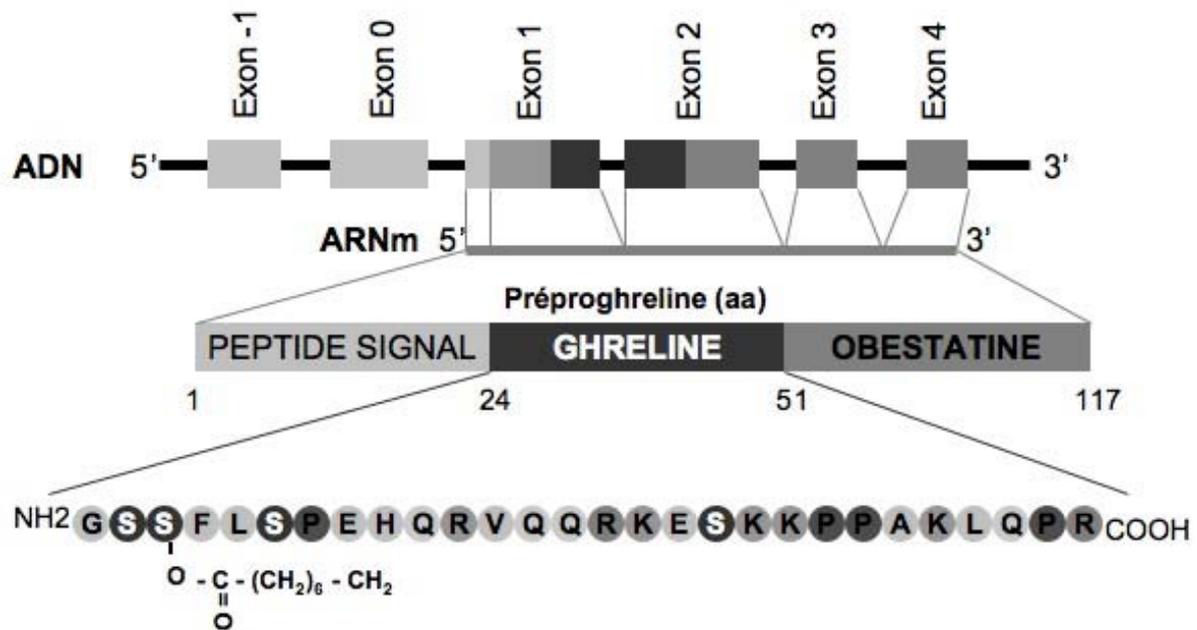


Figure 7. Structure du gène humain de la ghreline (adapté de Schellekens *et al.* 2010).

L'arginine en position 28 de la ghreline est parfois clivée à l'extrémité C-terminale de la ghreline par une carboxypeptidase, donnant un peptide ghreline de 27 aa qui se termine par une proline. La ghreline est soumise à une unique modification post-traductionnelle : l'acylation du groupement hydroxyle sur la Sérine en position 3. L'acylation de la ghreline a été retrouvée dans toutes les espèces étudiées. Le radical le plus fréquent est un groupe octanoyle (C8 : 0) mais il peut aussi être décanoyle (C10 : 0) voire décénoyle (C10 : 1) et toutes ces formes sont actives. Cette acylation est le fait d'une enzyme, la ghreline O-acyltransférase (GOAT) (Yang *et al.* 2008). Chez l'homme, la GOAT est exprimée principalement dans l'estomac, l'intestin et le pancréas et il semble que son activité est partiellement dépendante de la prise nutritionnelle, favorisée par l'ingestion d'acides gras ou de triglycérides à chaînes intermédiaires.

La désacyl-ghreline, pour laquelle le radical sur la sérine 3 a été enlevé, est la forme de ghreline circulante prédominante. Chez l'Homme et le rat, elle représente plus de 80% du peptide circulant. Cependant, dans les tissus gastriques, le ratio tombe à 66%, ce qui suggère que la

ghrelina produite est désacylée en entrant dans la circulation sanguine, expliquant la courte demi-vie plasmatique de la ghrelina (Pemberton & Richards 2008). La ghrelina non-acylée a d'abord été considérée comme un métabolite inactif de la ghrelina acylée car elle ne lie pas son récepteur connu, le GHS-R type 1a et ne présente pas d'activité endocrine. Cependant, la ghrelina non-acylée n'est pas biologiquement inactive car elle a montré des effets sur différents tissus, sans que le mécanisme de signalisation ne soit élucidé, ni qu'un récepteur spécifique ne soit identifié (Gauna *et al.* 2005).

La relation entre la ghrelina acylée et non-acylée n'est pas clairement déterminée. Elles sont toutes deux présentes dans le plasma humain comme dans l'estomac et sont toutes deux actives, avec des actions parfois similaires ou parfois opposées. L'origine de la ghrelina non acylée n'est pas précisément déterminée. Soit elle résulterait d'une acylation incomplète du peptide dont les deux formes seraient sécrétées par deux voies différentes. Dans ce cas, elle serait un autre peptide actif produit directement par le gène de la ghrelina. Soit elle résulterait de la désacylation de la ghrelina. Cette dernière théorie a donné lieu à la description d'enzymes responsables de la désacylation de la ghrelina. Ainsi, la butyrylcholinestérase et la platelet-activating factor acetylhydrolase, peuvent désacyler la ghrelina dans le sérum humain alors que dans le sérum du rat, seule la carboxylestérase est impliquée. De plus, la lysophospholipase I a été identifiée comme pouvant désacyler la ghrelina dans l'estomac du rat. De façon intéressante, ces enzymes sont associées avec des lipoprotéines sériques qui participent également au transport de la ghrelina. En effet, plusieurs études suggèrent que la ghrelina non-acylée circule librement alors que la majorité de la ghrelina acylée circulante est liée à de grosses molécules et notamment aux lipoprotéines. L'hydrophobicité majorée de la ghrelina par sa chaîne d'acide gras latérale pourrait être responsable de sa liaison à de grosses protéines plasmatiques dans le sang (Soares & Leite-Moreira 2008).

La concentration en ghreline plasmatique montre une variation diurne prononcée. Elle augmente avec le jeun, avant les repas et la nuit et elle est rapidement diminuée (moins d'une heure) par l'alimentation, particulièrement avec des menus très caloriques ou très sucrés (Tritos & Kokkotou 2006). Le pic préprandial de ghreline avant les repas ne dépend pas directement de la faim, mais plutôt de l'anticipation du repas et du plaisir qui peut y être pris. Ainsi, chez l'animal, ce pic dépend de la fréquence des repas et a tendance à leur faire préférer les aliments les plus sucrés. Les mécanismes à l'origine de la régulation négative de la ghreline systémique par l'alimentation sont inconnus (Tritos & Kokkotou 2006). Les patientes présentant une anorexie nerveuse ont des taux de ghreline circulante plus élevés que les patients contrôles (Misra *et al.* 2005).

Différentes stimulations ont montré un effet sur la concentration plasmatique de la ghreline. Ainsi, la stimulation cholinergique, l'administration d'une combinaison de GHRH - arginine et, chez les patients présentant une anorexie nerveuse, les oestrogènes et l'IGF1 peuvent augmenter la concentration de ghreline. En revanche, l'administration de glucose, d'insuline, de glucagon, de GH, de somatostatine, d'urocortine, d'oxyntomoduline ou de tous les peptides coupant potentiellement l'appétit peuvent diminuer la concentration de ghreline (Tritos & Kokkotou 2006).

5.2 RÉCEPTEUR DE LA GHRELINÉ

Le récepteur à la ghreline, ou GHS-R1a, est un RCPG typique avec sept domaines transmembranaires. Deux récepteurs distincts ont été isolés (Howard *et al.* 1996). Le GHS-R type 1a est un GPCR avec des propriétés fonctionnelles et de liaison correspondant à son rôle de récepteur de la ghreline. Le GHS-R type 1b est produit par un mécanisme d'épissage alternatif. Le gène des récepteurs de la ghreline est localisé sur le chromosome 3q26.2 et comprend deux

exons. Le premier code pour les cinq premiers domaines transmembranaires et le second pour les deux restants. Le GHS-R type 1b dérive uniquement du premier exon et ne comprend donc que cinq domaines transmembranaires (Figure 8). Le GHS-R type 1b est donc une forme tronquée de la partie COOH terminale du GHS-R type 1a. Le récepteur de la ghreline est très conservé à travers les espèces, ce qui suggère qu'il a des fonctions physiologiques primordiales (Kojima & Kangawa 2005).

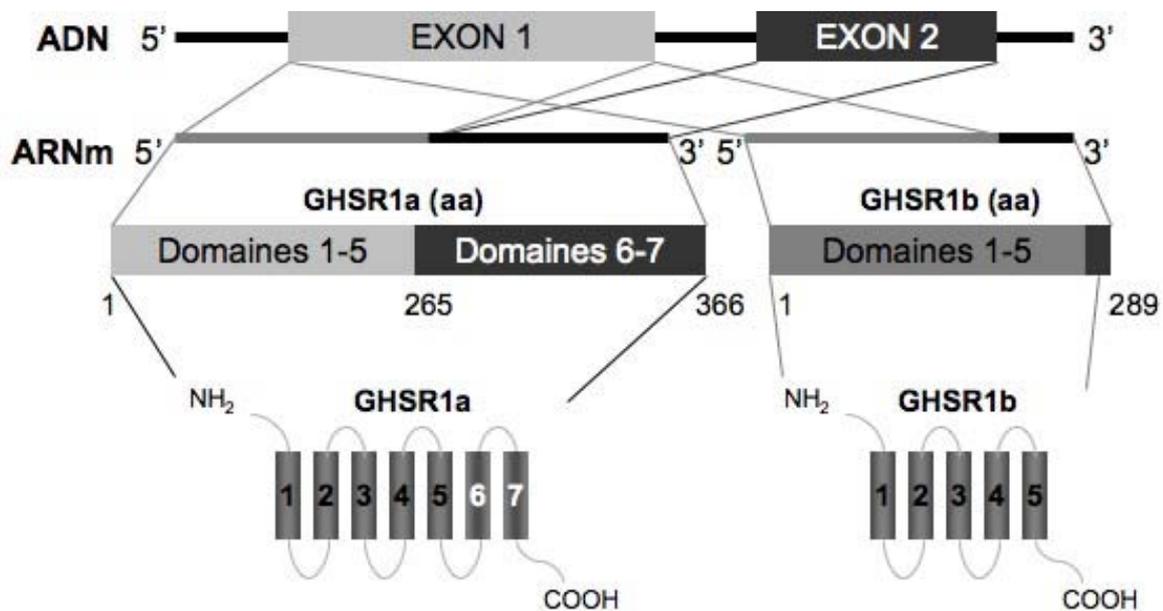


Figure 8. Structure du gène du récepteur de la ghreline (adapté de Schellekens *et al.* 2010).

Le GHS-R a plusieurs homologues dont les ligands sont des peptides gastro-intestinaux ou des neuropeptides qui sont trouvés dans les organes gastro-intestinaux et qui régulent les fonctions de ces organes. La superfamille du récepteur de la ghreline comprend ainsi le récepteur pour la motiline, la neuromédine U et la neurotensine. Elle contient également un récepteur orphelin, le GPR39. Le récepteur le plus proche du GHS-R type 1a est le récepteur de la motiline et d'ailleurs, la ghreline et la motiline présentent des séquences d'acides aminés similaires (Kojima & Kangawa 2005).

Le GHS-R type 1a est exprimé de façon prédominante dans deux zones cérébrales. D'abord dans l'hypophyse et plus précisément dans les cellules somatotrophes du lobe antérieur, ce qui est à mettre en rapport avec le rôle de régulation de la ghreline sur le relargage de GH. La seconde zone est l'hypothalamus et notamment dans le noyau arqué, une aire cruciale pour la stimulation de l'appétit. Le GHS-R type 1a est ensuite retrouvé plus discrètement dans d'autres zones cérébrales ce qui suggère une activité extra-hypothalamique de la ghreline. Bien qu'il soit exprimé principalement dans les tissus centraux neuroendocrines, le GHS-R type 1a a été retrouvé dans de nombreux tissus périphériques comme la glande thyroïde, le pancréas, la rate, les reins, le myocarde, les glandes surrénales, les ovaires, les testicules, l'estomac, les intestins ou encore le tissu osseux et les tissus dentaires. Cette large distribution périphérique suggère que la ghreline a d'autres fonctions que la régulation de la sécrétion de GH et l'homéostasie énergétique (Camina 2006).

Le GHS-R type 1b est largement exprimé dans les tissus périphériques en général, mais son rôle reste inconnu (Gnanapavan *et al.* 2002). Il ne peut pas lier la ghreline ou les GHSs, mais il est possible qu'il existe un autre ligand pour ce récepteur avec des effets physiologiques sur les tissus endocrines et non-endocrines (Camina 2006).

Des études semblent maintenant montrer l'existence d'autres récepteurs que le GHS-R type 1a, spécifiques à la ghreline non-acylée ou communs pour la ghreline acylée et non-acylée ou spécifiques pour les peptides GHSs (hexareline). Ces récepteurs seraient impliqués dans les effets non-endocrines de ces molécules (Camina 2006).

Le GHS-R1a peut fixer la ghreline acylée et des peptides GHSs non structurellement proches de la ghreline, grâce à un domaine de liaison commun, mais ne peut pas se lier à la ghreline non-acylée, la présence d'un radical sur la Ser3 étant essentielle à cette liaison. La liaison d'un ligand au GHS-R type 1a cause de profonds changements dans la conformation des hélices

α transmembranaires, ce qui libère des sites d'interactions avec les protéines G. Cette interaction entraîne la libération de guanosine diphosphate (GDP) par la sous-unité α de la protéine G et son échange avec une guanosine triphosphate (GTP). S'en suit une activation des différentes sous-unités de la protéine G qui initient des réponses intracellulaires en agissant sur différents effecteurs (Camina 2006).

Il faut noter cependant que le GHS-R1a a un niveau d'activité constitutive très important comparé aux autres RCPG, de l'ordre de 50%. Cela serait dû à la présence d'un noyau aromatique dans la partie interne du récepteur. Cette caractéristique structurale lui confère une conformation active stable et suggère que le GHS-R1a produit un signal positif relativement constant qui régule l'appétit et contre lequel doivent agir les hormones inhibitrices telles que la leptine et l'insuline (Petersen *et al.* 2009).

Une des fonctions du GHS-R type 1a les mieux caractérisées au niveau cellulaire est la régulation des courants ioniques. Les GHSs activent la mobilisation intracellulaire du calcium par la PI-PLC, via une protéine $G\alpha_q$. Dans les cellules somatotrophes, cette enzyme transforme le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP_2) du feuillet interne de la membrane plasmique en inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) et diacylglycérol (DAG). L' IP_3 entraîne le relargage du calcium depuis les réservoirs intracellulaires, alors que le DAG active la PKC. L'afflux de calcium active des canaux potassium voltage-indépendants ce qui hyperpolarise brièvement la cellule. Le courant primaire de calcium est suivi d'une entrée de calcium maintenue grâce à des canaux membranaires sensibles à la dépolarisation de la membrane, ce processus étant en partie dépendant de la PKC. Mais il semble exister des voies de signalisation alternatives pour la mobilisation du calcium induite par la ghreline. Ainsi, dans les neurones orexigènes exprimant le neuropeptide Y, l'augmentation du calcium intracellulaire par la ghreline dépend d'une stimulation par G_s de la voie de signalisation AMPc/PKA. La ghreline active d'autre part la cascade des MAPK dans différents systèmes cellulaires, mais selon différentes modalités. Dans les préadipocytes 3T3-L1,

cet effet est médié par une protéine G_i , via la voie PI3K/Akt, alors que dans les cellules d'hépatome, la ghreline agit via l'IRS-1 (Camina 2006). Ainsi, l'effet et les voies de signalisation consécutives à la stimulation du GHS-R type 1a varie selon les types cellulaires étudiés, comme pour de nombreux RCPG.

5.3 FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES

La ghreline acylée et la ghreline non-acylée sont toutes deux présentes dans le plasma humain et il peut parfois y avoir confusion. Le terme de « ghreline » est généralement utilisé dans les études pour « ghreline acylée » et le terme de « ghreline totale » pour la somme « ghreline acylée + ghreline non acylée ». Dans notre travail, « ghreline » désigne donc la ghreline acylée.

Régulation de la sécrétion de GH

La ghreline possède un effet stimulant puissant et dose dépendant sur la sécrétion de la GH à la fois *in vitro* et *in vivo*, et chez l'homme et l'animal. Le relargage de GH atteint un pic 5 à 15 minutes après l'administration de ghreline et revient au niveau basal après une heure. De plus, la sécrétion de GH atteint un niveau maximal grâce à une coadministration avec la GHRH (Kojima & Kangawa 2005). Cet effet semble résulter à la fois de la liaison directe de la ghreline sur son récepteur GHS-R1a au niveau des cellules somatotropes de l'hypophyse, d'une activation de la ghreline sur les neurones exprimant la GHRH, de l'inhibition des neurones exprimant la somatostatine au niveau hypothalamique et enfin d'une activation par la ghreline des voies vagales afférentes (Soares & Leite-Moreira 2008).

À hautes doses, la ghreline semble également stimuler la sécrétion de prolactine, de corticotropine et de cortisol. Les études animales de délétion génique suggèrent que ni la ghreline, ni son récepteur ne sont nécessaires à la croissance. Ces observations ne sont pas encore expliquées et elles ne sont pas forcément applicables à l'Homme, car des cas de familles de faible taille en relation avec une mutation du GHS-R ont été rapportés (Tritos & Kokkotou 2006).

En situation normale, la ghreline non-acylée n'influence pas la sécrétion de GH, car elle ne peut pas se lier au GHS-R1a. Cependant, dans une expérience de surexpression chez la souris, la désacyl-ghreline a modulé l'axe GH /IGF1 en réduisant la sécrétion de GH suivant l'administration de ghreline, ce qui a conduit à un phénotype plus petit (Ariyasu *et al.* 2005).

Régulation de l'homéostasie énergétique

La ghreline intervient à court terme sur la régulation de l'appétit et à long terme sur la régulation du poids. Elle est d'ailleurs la seule hormone orexigène connue. Chez les Hommes et les animaux, l'administration de ghreline augmente l'appétit et stimule l'alimentation. Les niveaux de ghreline circulante sont augmentés par le jeun, ce qui suggère un rôle de la ghreline dans l'initiation de l'alimentation. Dans une étude examinant le moment d'initiation volontaire du repas chez l'Homme, l'augmentation de ghreline intervient avant les repas et présente un profil temporel similaire aux scores de faim. Ce pic de sécrétion pré-prandial est en relation avec les habitudes alimentaires, ce qui suggère qu'il anticiperait la phase d'alimentation. Il disparaît suite à un repas ou l'administration de nutriments au niveau gastrique ou intestinal.

D'autre part, la composition du repas influence la sécrétion de ghreline, mais certains résultats sont contradictoires : la diminution du niveau de ghreline circulante est plus forte avec les protéines et les sucres comparé aux lipides, mais les niveaux de ghreline sont plus bas après l'ingestion de graisse par rapport aux sucres et aux protéines. Il semblerait que les changements postprandiaux des niveaux de ghreline sont corrélés avec l'intervalle entre les repas chez les sujets de poids normal seulement, et de façon indépendante de la composition du repas (De Vriese *et al.* 2010).

La prise alimentaire est contrôlée centralement par les neurones orexigènes de l'hypothalamus exprimant le neuropeptide Y (NPY) et la protéine agouti-related (AGRP), et par les neurones anorexigènes exprimant la pro-opiomelanocortine (POMC), l'hormone stimulant les mélanocytes- α (α -MSH), et les transcrits régulés par la cocaïne et les amphétamines (CART) (De

Vriese *et al.* 2010). La ghreline agit en périphérie comme médiateur du signal entre les intestins et le cerveau via des voies nerveuses afférentes vagales ou par la circulation sanguine. Une fois le signal arrivé au noyau arqué de l'hypothalamus, l'induction de l'alimentation par la ghreline résulte de l'activation des neurones exprimant NPY et AGRP (Soares & Leite-Moreira 2008). En effet, l'inhibition de ces neurones supprime l'action orexigène de la ghreline. Les mécanismes intracellulaires correspondants impliquent la protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate (AMPK). La ghreline liée à son récepteur induit une augmentation de la concentration calcique et active ainsi la calmoduline kinase-kinase 2 (CaMKK2) qui phosphoryle AMPK. L'action d'AMPK dirige une augmentation de la β -oxydation mitochondriale générant des radicaux oxygénés réactifs (ROS) ce qui stimule la transcription des NPY et AGRP. D'autre part, la ghreline agit pour la stimulation de l'appétit par d'autres voies. Elle inhibe les neurones POMC et CART, ce qui empêche la libération d' α -MSH et active l'expression d'orexine par des neurones hypothalamiques. Enfin, la ghreline est impliquée dans la régulation des comportements alimentaires au niveau du cerveau central (De Vriese *et al.* 2010).

Outre son effet à court terme, la ghreline peut réguler le poids corporel sur le long terme. Elle induit une augmentation de l'adiposité et du poids de l'organisme, pas seulement en stimulant la prise alimentaire et particulièrement celle de lipides, mais également en régulant d'autres aspects de l'homéostasie énergétique. Elle favorise le stockage des graisses, réduit le catabolisme énergétique et la lipolyse et augmente l'utilisation des sucres. La concentration plasmatique de ghreline est corrélée négativement avec l'indice de masse corporelle (IMC). Les patients obèses et anorexiques ont donc respectivement des taux de ghreline inférieur et supérieur au taux normal (De Vriese *et al.* 2010).

Les variations de poids entraînent une réponse compensatoire de la ghreline. Ainsi, suite à une perte de poids induite par des restrictions alimentaires et par une augmentation de l'exercice, les

niveaux de ghreline circulante augmentent. Cette réponse physiologique n'est pas constamment retrouvée pour les pertes de poids induites par une chirurgie gastrique par « bypass ». Cela peut s'expliquer par des différences entre patients dans la stabilisation de leur poids. Le gain de poids entraîne classiquement une diminution des taux de ghreline circulante. (De Vriese *et al.* 2010).

La ghreline non-acylée a montré des résultats contradictoires, mais la majorité des études suggèrent un effet central opposé à l'effet orexigène de la ghreline, induisant une balance énergétique négative (Soares & Leite-Moreira 2008).

Une pathologie spécifique pourrait éclairer le rôle physiologique de la ghreline. Le syndrome de Prader-Willi (SPW) est une maladie génétique rare caractérisée par un dysfonctionnement hypothalamo-hypophysaire. Il s'agit de la cause la plus fréquente d'obésité syndromique (1/20000 naissances) et il est causé par des modifications de segments chromosomiques. Cliniquement, à l'hypotonie sévère jusqu'à l'âge de 2 ans succèdent une hyperphagie extrême avec défaut de satiété et obésité morbide, des difficultés d'apprentissage et des troubles du comportement, un déficit intellectuel variable et des anomalies hypothalamo-hypophysaires associant un retard statural par déficit en hormone de croissance et un développement pubertaire incomplet. Le SPW est d'autre part caractérisé par une hyperghrelinémie dont l'origine est méconnue (Cummings *et al.* 2002, Feigerlova *et al.* 2008). Les taux de ghreline à jeun chez les patients porteurs du SPW sont 4,5 fois supérieurs à ceux d'obèses de poids équivalent, mais non touchés par le SPW, et 2,5 fois plus élevés que les contrôles non obèses et ceci, dès le plus jeune âge, avant le développement de l'obésité. L'hyperghrelinémie observée pourrait expliquer au moins 2 dysfonctions endocriniennes observées chez ces patients : l'obésité avec une satiété réduite et le déficit en GH. Ce déficit en GH pourrait résulter d'une résistance à la ghreline, tandis que l'obésité découlerait d'une action préservée de la ghreline sur le contrôle de l'appétit du fait de récepteurs différents (Tauber *et al.*

2004). Parallèlement, les sujets souffrant du SPW présentent un très fort taux de scoliose, avec une prévalence de 41 à 80 % selon les études. Ainsi, il semble exister un lien, sans parler de causalité pour l'instant, entre scoliose et ghreline dans ce syndrome.

Régulation du métabolisme glucidique

La ghreline administrée chez l'Homme induit une hyperglycémie qui ne résulterait pas seulement d'un effet endocrine, mais également d'un effet direct de la ghreline sur les hépatocytes. Elle peut moduler la néoglucogenèse et la synthèse de glycogène, augmentant ainsi la production de glucose par le foie.

D'autre part, le traitement par la ghreline entraîne une réduction de la sécrétion d'insuline dans les premières heures. Cet effet pourrait être médié par le GHS-R type 1a qui est exprimé dans le pancréas, mais la ghreline semble aussi réguler certains effets périphériques de l'insuline. Elle gêne la capacité de l'insuline à supprimer la production de glucose endogène, elle inhibe la sécrétion d'adiponectine sensibilisant les adipocytes à l'insuline et elle stimule la sécrétion d'hormones contre régulatrices comme la GH, le cortisol, l'épinéphrine ou encore le glucagon.

La ghreline non-acylée semble avoir là aussi un effet opposé à celui de la ghreline sur l'action de l'insuline. D'ailleurs, l'administration simultanée des deux formes de ghreline abolit les effets observés. Ces deux peptides n'agissent pas par le même récepteur et peuvent donc être considérés comme deux hormones séparées ayant une action antagoniste sur l'homéostasie glucidique (Soares & Leite-Moreira 2008).

Régulation du métabolisme lipidique

La ghreline est impliquée dans la régulation du métabolisme lipidique avec des effets sur le foie, les muscles squelettiques et le tissu adipeux. Dans le foie, la ghreline induit l'expression de gènes adipogéniques et favorise l'accumulation de triglycérides en réduisant l'activité d'oxydation des acides gras par l'AMPK. Par opposition, au niveau musculaire, la ghreline réduit la

concentration en triglycérides et favorise les activités oxydatives enzymatiques mitochondriales. De plus, elle augmente la concentration en PPAR γ qui réduit le contenu lipidique des muscles. La ghreline favorise donc la déposition des lipides au niveau du foie plutôt que dans les muscles. Enfin, la ghreline agit directement sur les adipocytes en stimulant leur prolifération et leur différenciation, en stimulant la lipogenèse *in vitro* et *in vivo* et en antagonisant la lipolyse. La ghreline non-acylée semble avoir un effet similaire sur le métabolisme lipidique (Soares & Leite-Moreira 2008).

Régulation de la motilité et de la sécrétion gastro-intestinale

La ghreline a une action stimulante sur la sécrétion exocrine gastrique et pancréatique qui serait importante pour la préparation à la digestion. Cependant, les résultats sont équivoques et semblent dépendre des conditions expérimentales selon les études.

La ghreline pourrait également stimuler la prolifération et la différenciation de l'épithélium gastro-intestinal. Elle a montré un effet protecteur de l'estomac lors de colites expérimentales et supprime l'apoptose dans la muqueuse intestinale chez des rats jeûnant.

Enfin, la ghreline a une action prokinétique, comme la motiline, sur la vidange gastrique et sur la motilité du colon (Soares & Leite-Moreira 2008).

Régulation de la reproduction

L'expression de la ghreline et de son récepteur a été retrouvé dans de nombreux organes reproducteurs, suggérant un rôle au moins paracrine-autocrine sur la physiologie de la reproduction. Ainsi, la ghreline semble avoir une action inhibitrice sur l'axe gonadotrophique (LH et GnRH) au niveau central (hypothalamus). Au niveau périphérique, les premières études semblent attribuer à la ghreline un rôle négatif sur la fonction reproductrice.

La ghreline non-acylée semble avoir un effet similaire (Soares & Leite-Moreira 2008).

Régulation de la fonction cardio-vasculaire

La ghrelina a montré de nombreuses actions cardiovasculaires. Pour la macro circulation, les effets vasoactifs de la ghrelina dépendent du territoire vasculaire. Dans la circulation systémique, elle a un effet vasodilatateur indépendant de l'endothélium alors qu'un niveau cardiaque, elle augmente la pression coronaire. Dans la microcirculation, elle semble augmenter le flux vasculaire ce qui pourrait affecter d'autres de ses fonctions.

In vitro, la ghrelina inhibe l'apoptose des cardiomyocytes, améliore la fonction myocardique et réduit la taille des infarctus. Chez des volontaires sains ou avec une faiblesse cardiaque chronique, la ghrelina diminue la résistance vasculaire systémique ce qui augmente le débit cardiaque.

La ghrelina non-acylée montre des résultats similaires (Soares & Leite-Moreira 2008).

Régulation de la fonction immunitaire

La ghrelina peut moduler la prolifération des cellules immunitaires, notamment les lymphocytes T. Cela augmente la résistance à l'initiation de processus néoplasiques et métastatiques chez la souris. Elle module également la sécrétion de cytokine pro inflammatoires comme IL6 et TNF α . Cela donne à la ghrelina un rôle de régulateur négatif de l'expression de cytokines inflammatoires (Soares & Leite-Moreira 2008).

La vie sans ghrelina

L'estomac est la source principale de ghrelina. La gastrectomie totale pratiquée lors de traitements de cancers ou d'ulcères sévères entraîne une diminution de la concentration plasmique de ghrelina de 30 à 50%. Cette concentration peut remonter à 70% du taux initial grâce à une possible compensation par les intestins et le pancréas. Il est intéressant de noter que cette opération induit une ostéopénie chez les patients, ce qui suggère l'implication de la ghrelina dans la régulation de l'ostéogenèse (Kojima & Kangawa 2005).

Une souris KO pour la ghreline a été conçue (Sun *et al.* 2003, Wortley *et al.* 2004) et son phénotype montre une taille et une croissance normale, une alimentation, une reproduction et une composition corporelle sans aucun changement pathologique. Ces observations semblent en désaccord avec les résultats spécifiques obtenus et cette dissonance n'est pas encore expliquée. Cependant, avec une alimentation grasse, cette souris a une tendance à conserver une faible masse grasseuse. Cela indique que la ghreline n'est pas un facteur orexigénique indispensable, mais intervient pour la détection et le traitement des différents substrats métaboliques (Kojima & Kangawa 2005).

Une souris KO pour le GHS-R type 1a n'a pas montré les effets classiques sur le relargage de GH et la prise alimentaire après une administration de ghreline, ce qui montre que le GHS-R type 1a est bien le récepteur majeur de la ghreline (Sun *et al.* 2004). Sa croissance et son développement sont normaux. La ghreline et son récepteur ne sont donc pas indispensables à la croissance et à la régulation de l'appétit. Cependant, un rat transgénique exprimant un ARNm anti sens du GHS-R type 1a dans l'hypothalamus pour bloquer la voie de signalisation de la ghreline (Shuto *et al.* 2002) montre un poids inférieur, consomme moins de nutriments et a moins de tissu adipeux qu'un rat normal. Il semble donc qu'il y ait, dans le cas de la souris KO, un mécanisme compensatoire non expliqué.

Régulation de la prolifération et de la survie cellulaire

La ghreline a un rôle dans la régulation de la prolifération, l'apoptose et la différenciation de différents type cellulaires normaux et néoplasiques par des mécanismes dépendants ou non du GHS-R type 1a. Ainsi, elle stimule la prolifération et inhibe l'apoptose de cardiomyocytes, de préadipocytes, de cellules de la zone glomerulée des surrénales, de cellules bêta du pancréas, de kératinocytes ou encore de cellules de la lignée ostéoblastique. L'action périphérique de la ghreline n'est donc pas qu'une modulation de fonction cellulaire, mais aussi une régulation de la survie de cellules cibles.

La ghreline et son récepteur sont coexprimés dans différentes tumeurs, ce qui suggère qu'ils pourraient jouer un important rôle autocrine/paracrine dans le développement néoplasique. *In vitro*, la ghreline a montré des effets stimulants ou inhibants sur la prolifération de différentes lignées cellulaires tumorales humaines. Un effet antiprolifératif a été montré sur les lignées issues de cancers à petites cellules, du sein, de la thyroïde et du carcinome de la prostate, alors qu'un effet prolifératif a été montré sur des lignées issues d'hépatomes, de carcinome de la prostate et de carcinome du pancréas. De plus, la ghreline agit sur la prolifération néoplasique en inhibant les facteurs angiogéniques.

La ghreline non-acylée partage de nombreux effets sur la prolifération cellulaire, l'apoptose et la différenciation avec la ghreline (Soares & Leite-Moreira 2008).

Régulation de la physiologie osseuse

Les désordres osseux rencontrés chez l'homme après une ablation totale de l'estomac (gastrectomie) sont connus depuis très longtemps, un article en langue allemande datant de 1941 rapporte une ostéomalacie liée à cette intervention (Sarasin, *Gastroenterologia* 1941). Le taux global de fractures vertébrales et/ou d'ostéopénie chez ces patients atteint 55% (Zittel *et al.* 1997). Plus récemment, Lehto-Axtelius *et al.* ont démontré en 2002 que chez le rat, l'ablation totale de l'estomac ou simplement du fundus, la partie de l'estomac sécrétant entre autres hormones la ghreline, conduit à une ostéopénie très marquée, notamment au niveau de la calvaria. Cela s'expliquerait par un déficit hormonal induit dans la circulation par cette chirurgie. En effet, la concentration de ghreline plasmiq ue diminue proportionnellement à la portion du fundus réséquée. Pour préserver la densité osseuse, il faudrait donc conserver au moins 10 à 30 % du fundus (Lehto-Axtelius *et al.* 2002). Ce lien entre la source principale de ghreline et le métabolisme osseux a conduit à développer les recherches sur l'influence particulière de la ghreline sur le tissu osseux.

Il est établi que le métabolisme osseux est directement dépendant de l'axe GH/IGF1. Ce sont les déterminants essentiels de la croissance osseuse longitudinale, de la maturation et du remodelage squelettique ainsi que de l'acquisition et du maintien de la masse osseuse. Or la sécrétion de GH est régulée traditionnellement, au niveau de l'hypophyse, par la GHRH, la somatostatine et, de découverte plus récente, par la ghreline. Cela confère donc un rôle à la ghreline dans le métabolisme osseux via cet axe GH/IGF1. Schématiquement, la ghreline s'assurerait que suffisamment d'énergie soit disponible pour que l'hormone de croissance puisse stimuler le développement. Mais, outre cet effet central, la ghreline semble indépendamment avoir des effets périphériques autocrine/paracrine sur le tissu osseux (Nikolopoulos *et al.* 2010).

ÉTUDES *IN VIVO* :

Cet effet périphérique de la ghreline a été introduit pour la première fois par Sibilis *et al.* en 1999 dans une étude *in vivo* sur des rats. Ils ont traité ces rats pendant 30 jours avec de l'hexareline, un GHS ayant une activité de relargage de la GH comme la ghreline et agissant via le même récepteur, le GHS-R type 1a. Ils ont alors observé un effet protecteur du tissu osseux de ce traitement et plus particulièrement, un effet d'inhibition de la résorption osseuse indépendant de la GH, ce qui indique que d'autres mécanismes sont impliqués pour expliquer l'effet positif des GHS sur le tissu osseux (Sibilis *et al.* 1999).

Ces résultats ont été confirmés pour la ghreline en 2005 par Fukushima *et al.* Une perfusion intrapéritonéale de ghreline pendant 4 semaines chez des rats témoins et des rats nains déficients en GH a entraîné une augmentation de la densité minérale osseuse dans les deux groupes. L'effet bénéfique de la ghreline et des GHS sur l'os est donc bien indépendant de la GH (Fukushima *et al.* 2005).

La même année, une autre équipe a traité des souris gastrectomisées avec des injections de ghreline pendant 8 semaines et n'ont pas observé de bénéfices sur le tissu osseux (Dornonville de la Cour *et al.* 2005). On peut leur opposer que 8 semaines reste un délai court pour observer

des variations de minéralisation. De plus, Fukushima *et al.* rappelaient que la souris KO pour la ghreline conçue en 2003 (Sun *et al.* 2003) ne présentait pas de changement au niveau osseux, ce qui suggérait que la ghreline ne serait pas nécessaire à la formation osseuse. Cependant, le métabolisme osseux est régulé par diverses voies de signalisation qui pourraient compenser une voie défaillante et expliquer ce résultat paradoxal (Fukushima *et al.* 2005).

La majorité des études menées sur des adultes n'ont révélé aucune corrélation significative entre les taux plasmatiques de ghreline et les BMC (bone mineral content) et/ou BMD (bone mineral density) ou les marqueurs osseux. Cependant, en 2005, Misra *et al.* montrent que chez les adolescentes saines de 12 à 18 ans, le taux de ghreline est un puissant facteur prédictif de la BMD au niveau des vertèbres lombaires et de la hanche, indépendamment de la composition corporelle, de l'axe GH/IGF-1, du cortisol et de l'estradiol. Cependant, aucune corrélation n'est retrouvée entre le taux de ghreline et des marqueurs de turn-over osseux (Misra *et al.* 2005).

En 2007, Huda *et al.* étudient l'effet de la ghreline sur les taux plasmatiques de marqueurs de formation (P1NP) ou de résorption (β CTX) osseuses, dans une population de témoins et de patients gastrectomisés âgés de 31 à 75 ans. Après ajustement par l'âge et l'IMC (indice de masse corporelle), la concentration basale de ghreline plasmatique apparaît être inversement corrélée au taux basal de β CTX. Ceci n'est pas retrouvé pour P1NP. Cependant, ils n'ont noté aucun effet significatif de la perfusion de ghreline pendant 4 heures sur les concentrations plasmatiques de β CTX ou de P1NP dans aucun groupe. Ils concluent donc que la ghreline exogène n'a pas d'effet à court terme sur les marqueurs osseux chez les contrôles sains ni les patients gastrectomisés, mais que le taux de base de ghreline circulante est inversement corrélée à la résorption osseuse (Huda *et al.* 2007).

Une autre étude *in vivo*, réalisée en 2008, a montré l'effet bénéfique de l'application locale de ghreline sur la cicatrisation de défauts osseux de taille critique sur des rats. Ce protocole utilisé classiquement en expérimentation animale permet d'évaluer l'intérêt d'un matériel pour le tissu osseux en le plaçant dans une cavité pratiquée aux dépens de la calvaria de rats. La cicatrisation

est ensuite comparée avec les témoins. Cela a permis de montrer une augmentation des marqueurs osseux ainsi qu'un bénéfice de cicatrisation du tissu osseux membranaire avec l'utilisation de ghreline (Deng *et al.* 2008). Cette étude ouvre de nouvelles perspectives d'utilisation thérapeutique locale de la ghreline, notamment lors d'interventions chirurgicales ou de régénération osseuse parodontale pour favoriser la cicatrisation du tissu osseux.

En résumé, les résultats contradictoires de ces différentes études *in vivo* montrent que l'action de la ghreline sur la physiologie osseuse reste mal connue, particulièrement chez l'Homme. D'autres études sont nécessaires pour préciser l'effet de la ghreline sur le tissu osseux.

ÉTUDES *IN VITRO* :

En 2005, Maccarinelli *et al.* ont trouvé l'expression de l'ARNm du GHS-R type 1a dans leur étude sur des cultures primaires de cellules ostéoblastiques de rats et ont montré que l'administration de ghreline (10^{-11} à 10^{-8} M) à ces cellules stimule la prolifération et l'expression de marqueurs de différenciation (PAL et Ostéocalcine) (Maccarinelli *et al.* 2005). Dans le même temps, Fukushima *et al.* ont montré l'expression de la ghreline et du GHS-R type 1a dans des cellules ostéoblastiques de rat, issues de cultures primaires et de la lignée UMR-106. Ils montrent également que la ghreline (10^{-11} à 10^{-8} M) stimule la prolifération des cellules ostéoblastiques primaires spécifiquement via le GHS-R type 1a grâce à un antagoniste de ce récepteur. Enfin, dans leur étude, la ghreline a stimulé l'expression des marqueurs de différenciation ostéoblastique (Runx2, Coll I, PAL et Ostéocalcine) et a favorisé la minéralisation calcique par ces cellules primaires (Fukushima *et al.* 2005). La ghreline a donc un effet prolifératif et différenciant sur des cellules de la lignée ostéoblastique chez le rat.

Kim *et al.* ont identifié l'expression du GHS-R1a dans des ostéoblastes primaires murins et dans plusieurs lignées ostéoblastiques dont, pour la première fois, deux humaines (murine :

MC3T3-E1, rat : ROS 17/2.8, UMR-106 et humaines : MG63 et SaOS2). Ils retrouvent ensuite les résultats de Maccarinelli *et al.* et Fukushima *et al.* sur la prolifération et la différenciation des cellules ostéoblastiques murines. Le traitement des cellules murines (MC3T3-E1) avec de la ghreline (10^{-11} à 10^{-7} M) induit une stimulation de la prolifération dose dépendante, abrogée par l'utilisation d'un antagoniste du GHS-R type 1a (D-lys3-GHRP-6). Ils montrent en plus que ce traitement par la ghreline inhibe l'apoptose induite par le $TNF\alpha$ et d'autre part que l'effet prolifératif de la ghreline passe par la voie des MAPK (Kim *et al.* 2005).

La concentration minimale effective utilisée dans ces études était de 10^{-11} M, ce qui est proche de la concentration normale dans le sérum des rongeurs (de l'ordre de 3×10^{-10} M). Cela suggère que la ghreline peut agir comme mitogène sur les ostéoblastes murins à des concentrations physiologiques. Ces expérimentations n'ont pas été réalisées sur les lignées humaines.

En 2006, Delhanty *et al.* n'ont pas pu détecter l'expression du GHS-R type 1a dans des cellules ostéoblastiques humaines en primoculture issues de deux biopsies d'os fémoral humain ostéoarthritique et dans les cellules ostéoblastiques de la lignée SV-HFO (cellules ostéoprogénitrice d'après Iba *et al.* 1995). En revanche, ils ont trouvé l'expression des ARNm de la ghreline et du récepteur GHS-R type 1b et ont montré que l'expression de la ghreline et du GHS-R type 1b tend à augmenter lors de la différenciation ostéoblastique terminale des cellules SV-HFO. La production de ghreline par les ostéoblastes a ensuite été vérifiée par dosage de la ghreline totale dans le milieu sur 72 heures.

Le traitement des cellules ostéoblastiques SV-HFO par la ghreline (10^{-11} à 10^{-7} M) induit là aussi une stimulation dose dépendante de la prolifération, en milieu classique et en milieu différenciant (dexaméthasone). Cependant, cette stimulation est moins marquée sur les cellules différenciées (5 jours seulement). D'autre part, cet effet décline puis s'éteint à partir de la deuxième semaine de culture en milieu classique et dès le sixième jour en milieu ostéogénique. La ghreline non-acylée montre les mêmes effets, mais à dose plus haute (10^{-8} M contre 10^{-9} M pour la ghreline acylée).

En utilisant des inhibiteurs des voies MAPK et PI3K sur les cellules SV-HFO en milieu classique, ils ont bloqué l'effet prolifératif des deux types de ghreline. Enfin, ils ont montré que les ghrelines (10^{-8} M pour la ghreline et 10^{-7} M pour la ghreline non-acylée) stimulent la phosphorylation de ERK dans ces cellules ostéoblastiques. Cela montre que l'effet prolifératif de la ghreline passe par les voies de signalisation MAPK et PI3K. Ils n'ont pas réussi à montrer un effet des ghrelines acylée et non acylée sur l'activité phosphatase alcaline et la minéralisation des cellules SV-HFO (Delhanty *et al.* 2006).

Cette étude retrouve donc chez l'humain les effets prolifératifs obtenus précédemment sur des ostéoblastes murins, mais pas les effets différenciants. D'autre part, elle met en avant une perte de l'effet proprolifératif de la ghreline avec la différenciation ostéoblastique que les auteurs mettent en relation avec l'augmentation de l'expression du GHS-R type 1b qui est a priori non fonctionnel. Cela pourrait suggérer un effet inhibiteur de cette expression pour l'effet stimulant de la ghreline.

Enfin, l'absence d'expression du GHS-R type 1a dans ces cellules et l'action effective de la ghreline non-acylée qui ne peut pas se lier au GHS-R type 1a suggèrent qu'il existe un autre récepteur médiant les effets périphériques de la ghreline sur les ostéoblastes humains. Ce résultat est assez étonnant, car en contradiction avec Kim *et al.* en 2005 qui avaient montré l'expression du GHS-R type 1a dans les lignées humaines MG63 et SaOs.

De même, Wang *et al.* en 2009 ont montré à l'aide d'un inhibiteur spécifique, le D-Lys3-GHRP6, que les effets prolifératifs de la ghreline (10^{-10} à 10^{-7} M) sont médiés par le GHS-R type 1a dans des ostéoblastes humains TE85. Ils ont en outre montré, par l'utilisation d'antagonistes et d'agonistes, que cet effet est dépendant de la voie de signalisation NO/GMPc (Wang *et al.* 2009).

Plusieurs études ont suggéré que la ghreline stimule directement la différenciation ostéoblastique (Maccarinelli *et al.* 2005, Fukushima *et al.* 2005, Kim *et al.* 2005).

En 2009, Kim *et al.* ont étudié le rôle éventuel de la ghreline dans la première phase de la différenciation, celle de l'engagement des cellules souches mésenchymateuses vers une lignée cellulaire particulière. En utilisant des cellules souches mésenchymateuses d'embryon de souris (C3H10T1/2), ils ont d'abord mis en évidence la présence du récepteur GHS-R1a dans ces cellules, avec une expression croissante durant la différenciation adipocytaire et décroissante durant la différenciation ostéogénique sur 9 jours. Ils ont montré eux aussi un potentiel prolifératif et anti-apoptotique de la ghreline sur ces cellules. Mais ils ont surtout démontré que la ghreline inhibe de façon dose-dépendante la différenciation ostéogénique précoce (7 jours en milieu ostéogénique), conclusion objectivée par la baisse de l'activité PAL et de l'expression des ARNm d'Osterix, de la PAL et du collagène de type I. Ils ont enfin mis en évidence une diminution de l'expression protéique de Runx2 et inversement une augmentation de celles de PPAR γ et C/EBP α dans les cellules traitées par la ghreline, sans pouvoir en expliquer le mécanisme. Kim *et al.* concluent à une action proliférative et anti-apoptotique de la ghreline sur les cellules souches mésenchymateuses et à un effet inhibiteur sur l'engagement de ces cellules vers la lignée ostéogénique via une suppression de l'expression de Runx2 et une augmentation de l'expression de PPAR γ et C/EBP α (Kim *et al.* 2009).

Comme nous l'avons vu précédemment, l'expression de Runx2 est nécessaire à l'engagement des progéniteurs vers la lignée ostéoblastiques, mais ne l'est plus pour la maturation du phénotype ostéoblastique. Cette étude montre donc un effet négatif de la ghreline sur l'engagement des cellules souches vers la lignée ostéoblastique, mais ne présage pas de son action sur la différenciation fonctionnelle terminale de l'ostéoblaste.

Plus récemment, Pancheco-Pantoja *et al.* en 2011 ont étudié l'effet de différentes hormones intestinales sur trois lignées cellulaires ostéoblastiques humaines (MG63, TE85 et SaOs). Ils ont confirmé l'expression du GHSR1a dans les trois lignées à des niveaux différents. En ce qui concerne l'effet de la ghreline, ils ont retrouvé une stimulation de la viabilité cellulaire

sur les MG63 et les TE85, mais pas pour les SaOs. A contrario, ils ont montré une stimulation de la production de phosphatase alcaline sur SaOs et de façon moindre sur TE85, mais pas sur MG63. Ils concluent de façon intéressante en suggérant que l'effet de la ghreline sur les ostéoblastes pourrait dépendre de leur stade de différenciation (Pancheco-Pontoja *et al.* 2011).

D'autre part, Caminos *et al.* ont montré en 2005 chez la souris, le rat et l'Homme que la ghreline est sécrétée et localisée dans les zones proliférative et de maturation de la plaque de croissance, mais ils n'ont pas pu trouver d'expression du GHS-R type 1a. En revanche, l'analyse des courbes de Scatchard, suite à la fixation de ghreline marquée à ^{125}I , suggère la présence d'au moins deux récepteurs à la ghreline non identifiés, respectivement de haute et basse affinités. Sur ces cellules, la ghreline inhibe l'activité métabolique cellulaire, entraîne une accumulation intracellulaire d'AMPc et inhibe la capture d'acides gras. Ainsi, ils suggèrent que la ghreline produite par les chondrocytes pourrait influencer de façon autocrine/paracrine sur l'hypertrophie des chondrocytes en favorisant la synthèse de protéoglycanes et sur leur apoptose, permettant l'initiation de la formation osseuse endochondrale (Caminos *et al.* 2005).

En 2009, la même équipe a montré que l'ARNm de l'enzyme responsable de l'acylation de la ghreline, la GOAT, est exprimé dans des lignées chondrocytaires immortalisées humaines et dans les chondrocytes humains en culture. Ils ont également montré, dans la lignée chondrocytaire murine ATDC-5, que l'expression de l'ARNm de la GOAT est basse au stade précoce de différenciation et augmente progressivement dans les stades tardifs, suggérant un rôle de la ghreline dans la différenciation chondrocytaire tardive initiant l'ossification endochondrale (Gomez *et al.* 2009).

Ces études *in vitro* suggèrent donc un rôle potentiel de la ghreline non seulement en faveur de l'ossification membranaire (Tableau 3), mais également de l'ossification endochondrale.

Tableau 3. Actions de la ghreline sur le tissu osseux dans les études *in vitro*

Référence	Dose	Cellules	Action
Maccarinelli <i>et al.</i> 2005	10^{-11} M à 10^{-8} M	Rat : ostéoblastes primaires	- Stimule la prolifération - Favorise la différenciation (PAL & OC)
Fukushima <i>et al.</i> 2005	10^{-11} M à 10^{-8} M	Rat : ostéoblastes primaires	- Stimule la prolifération via GHSR1a - Favorise la différenciation (Runx2, Coll I, PAL, OC) et la minéralisation
Kim <i>et al.</i> 2005	10^{-11} M à 10^{-7} M	Souris : lignée préostéoblastique MC3T3-E1	- Stimule la prolifération de façon dose dépendante via GHSR1a et les MAPK - Inhibe l'apoptose induite par $TNF\alpha$ - Favorise la différenciation (Coll I, PAL, OC) et la minéralisation
Delhanty <i>et al.</i> 2006	10^{-8} M à 10^{-7} M	Homme : lignée ostéo-progénitrice SV-HFO	- Stimule la prolifération via ERK et PI3K, mais pas GHSR1a - Pas d'effet sur la différenciation
Wang <i>et al.</i> 2009	10^{-10} M à 10^{-8} M	Homme : lignée ostéoblastique TE85	- Stimule la prolifération via GHSR1a et la voie NO/GMPc
Kim <i>et al.</i> 2009	10^{-13} M à 10^{-7} M	Souris : lignée mésenchymateuse C3H10T1/2	- Stimule la prolifération - Inhibe l'apoptose - Inhibe la différenciation ostéogénique précoce (Runx2, Osterix, Coll I, PAL)
Pancheco-Pontoja <i>et al.</i> 2011	10^{-12} M à 10^{-9} M	Homme : lignées préostéoblastique MG63, ostéoblastique jeune TE85 et ostéoblastique mature SaOs	- Stimule la viabilité cellulaire des MG63 et TE85 - Favorise la différenciation des TE85 et SaOs (PAL)

Au-delà de ces résultats physiologiques, il est intéressant de mettre en relation ces actions de la ghreline avec la pathologie. Ainsi, les patients atteints de scoliose idiopathique de l'adolescent (SIA) présentent un contrôle anormal de la balance énergétique, avec des valeurs basses de l'IMC. Or, ces anomalies sont connues pour dépendre en partie de la ghreline et une caractéristique de ces patients est qu'ils présentent une tendance à l'hyperghrelinémie (résultats de l'équipe non publiés), comme les patients atteints du syndrome de Prader-Willi (Feigerlova *et al.* 2008). De plus, ces patients présentent souvent en parallèle une densité osseuse basse pour leur âge, voire une véritable ostéoporose, et nous venons d'introduire le fait que la ghreline a une action sur la lignée ostéoblastique par le biais de récepteurs présents sur ces cellules. Enfin, il est tentant de mettre en parallèle le fonctionnement de la ghreline avec les résultats montrés par l'équipe de Moreau sur la mélatonine pour la SIA. Nous avons vu précédemment qu'il existe une potentielle résistance cellulaire à la mélatonine des cellules ostéoblastiques des patients atteints de SIA, du fait de la phosphorylation de résidus sérine au niveau des protéines Gi liées au récepteur RCPG de la mélatonine. Or, le récepteur de la ghreline GHS-R1a est un RCPG dont le fonctionnement est encore mal connu dans l'ostéoblaste. L'existence pour la ghreline d'un effet Gi équivalent à celui démontré pour la mélatonine est donc envisageable.

Ces données ajoutées avec les découvertes d'une hyperghrelinémie concomitante d'une forte prévalence de scolioses dans le syndrome Prader-Willi tendent à conférer à la ghreline un rôle dans l'étiopathogénie des SIA via une éventuelle résistance à la ghreline selon un mécanisme proche de celui étudié pour la mélatonine. Cette hypothèse est à l'origine de mon travail expérimental sur la ghreline et fait l'objet de recherches par notre équipe, dans le laboratoire INSERM et dans l'unité d'endocrinologie pédiatrique à l'hôpital pour enfants du CHU Purpan.

CHAPITRE II

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

I. Étude préliminaire :

Action du LPA sur la cicatrisation osseuse chez le rat Wistar.

1.1 OBJECTIF

La chirurgie de régénération vise à recréer un tissu perdu au cours d'un processus pathologique ou de son traitement. Ce tissu, une fois mature, doit être identique dans sa structure et sa fonction au tissu d'origine (Diss *et al.* 2003). Il est avéré que dans le cas de lésions osseuses de volume réduit, la cicatrisation naturelle aboutit à une régénération ad integrum (Becker & Becker 1999). En revanche, lorsque la perte de substance est trop importante et surtout, si elle n'est plus entourée de murs osseux, il se produit une réparation aboutissant en partie à un tissu cicatriciel fibreux (Schmitz & Hollinger 1986). Ce dernier n'est pas pathologique, mais ne possède pas les propriétés biologiques et mécaniques du tissu osseux originel. À partir des trois composants fondamentaux du tissu osseux que sont la matrice extracellulaire, les cellules et les éléments vasculaires, différentes stratégies sont mises en œuvre pour favoriser sa régénération et l'utilisation de facteurs biologiques en fait partie (Albrektsson & Johansson 2001). Cette étude préliminaire visait donc à évaluer l'intérêt du LPA, un facteur biologique particulier, en application locale pour la cicatrisation osseuse.

1.2 MATERIEL ET METHODES

Le modèle animal

Les modèles pré cliniques offrent l'opportunité d'observer la cicatrisation et d'évaluer l'efficacité et le succès de matériaux visant à soutenir ou à induire une régénération osseuse avant une application clinique (Schmitz & Hollinger 1986). Des études ont été réalisées sur des modèles rongeurs, félins, canidés, ongulés et primates non humains. Aucune de ces espèces n'offre un équivalent anatomique et physiologique à l'homme (Wikesjo & Selvig 1999). Les variations interspèces incluent l'anatomie, la quantité et la caractérisation de l'os,

l'environnement local et physiologique, le comportement animal et le taux de cicatrisation et cela peut interférer avec l'évolution des sites expérimentaux.

Le rat albinos est le modèle animal de laboratoire le plus utilisé. Cet usage étendu est dû à de nombreux facteurs comme son faible coût, son faible encombrement, sa robustesse, sa traçabilité, son régime omnivore, ses grandes portées et sa rapidité de reproduction. Le Wistar institute of anatomy and biology a maintenu une colonie de rats albinos pour produire le matériel nécessaire aux investigations de laboratoire et cela selon de nouvelles méthodes d'élevage. De ce travail a résulté un rat standardisé, stable génétiquement, qui en fait un outil de travail exceptionnel, satisfaisant pour la recherche appliquée à la biologie humaine. Enfin, le fait qu'il soit autant utilisé à travers tous les laboratoires du monde permet aux chercheurs de comparer leurs travaux (Wiesmann *et al.* 2004).

Le choix du modèle animal pour notre expérimentation s'est donc porté sur le rat Wistar.

Protocole opératoire

L'étude est menée sur des rats mâles de race Wistar, âgés de quatre à cinq mois et pesant de 350 à 400 grammes. Le protocole porte sur 12 rats repartis au hasard et pour moitié entre les groupes témoin et expérimental. Ils sont anesthésiés par injection de sulfate de kétamine (1cc /100g) et le sommet du crâne est rasé et désinfecté. Une incision sagittale décalée est pratiquée le long de la suture interpariétale et le décollement d'un lambeau de pleine épaisseur expose la calotte crânienne. Une trépanation de 5 mm de diamètre est pratiquée sous irrigation sans léser les méninges. Le fragment osseux isolé doit ensuite être enlevé délicatement à l'aide d'une précelle droite.

Pour le groupe expérimental, la lésion est comblée par une éponge de collagène imbibée d'une solution de LPA à 100 μ M. Dans le groupe témoin, on comble la lésion par une éponge de collagène imbibée d'une solution de sérum physiologique sans acides gras. Le périoste est toujours repositionné sur la trépanation et suturé au fil résorbable 4/0 (Figure 9). La peau est

ensuite suturée au fil 3/0. Deux rats témoins et deux rats expérimentaux, choisis par tirage au sort, sont sacrifiés sous anesthésie 15, 30 et 60 jours après la chirurgie.



Figure 9. Protocole chirurgical. A. Aménagement de l'accès à la calvaria, B. Mise en place de l'éponge collagène, C. Suture du plan profond.

Méthode histologique

Les têtes sont prélevées et sont fixées dans le formol à 10% et pH 7. Les calottes crâniennes sont ensuite déminéralisées dans l'acide nitrique à 4%, puis déshydratées dans des bains d'alcool de concentration croissante. Les prélèvements sont ensuite imprégnés puis inclus en paraffine. La coupe se fait au microtome (Jung Autocut de Leica®). Les coupes sériées de 5µm d'épaisseur passant par le tiers central de la trépanation sont colorées en technique trichrome de Masson pour l'analyse histologique.

1.3 RESULTATS

15 jours après chirurgie (J15)

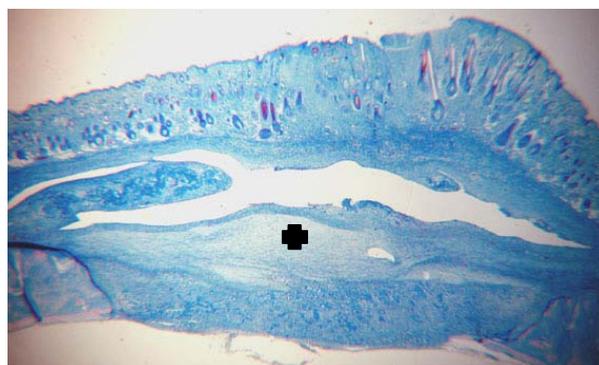


Figure 10. Coupe de site témoin à J15 (grossissement x25).

Pour les sites témoins, un infiltrat hémorragique, au sein d'un tissu conjonctif fibreux peu organisé, occupe la lésion. Les trousseaux de collagène de l'éponge (■ Figure 10) sont toujours visibles, mais en voie de résorption. Une légère apposition osseuse peut se remarquer sur le dessus de la calotte crânienne, au niveau des bords de la lésion (★ Figure 12).

Au niveau des sites expérimentaux, l'éponge de collagène reste également visible et l'épaisseur du site est normale. Le tissu conjonctif fibreux est ici aussi infiltré d'hématies, mais il est plus organisé longitudinalement et des foyers de régénération osseuse sont évidents.

Sur un des deux animaux, cette régénération s'observe au niveau des bords de la trépanation (★ Figure 11). Sur l'autre, la réaction ostéogénique est « explosive ». Elle concerne d'une part les bords de la lésion (★ Figure 12), avec une continuité entre les travées néo-formées et la calotte d'origine, et d'autre part le centre avec une importante zone d'ossification au contact des méninges. Celle-ci est limitée par du tissu conjonctif fibreux sous périoste dans lequel persistent des restes de l'éponge collagène (■ Figures 11 et 12).

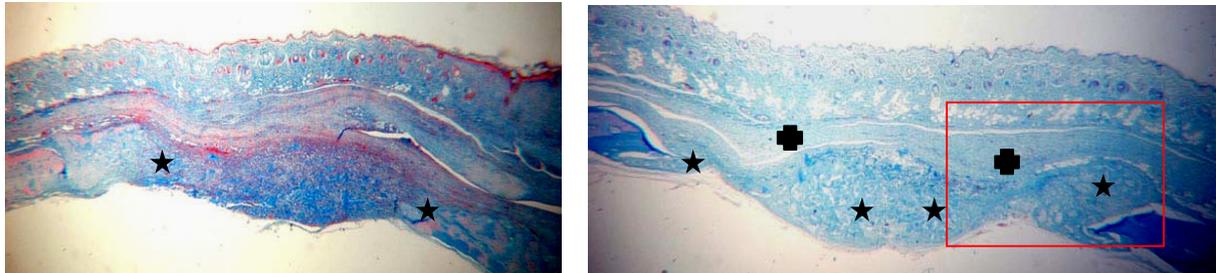


Figure 11. Coupes des sites expérimentaux à J15 (grossissement x25).

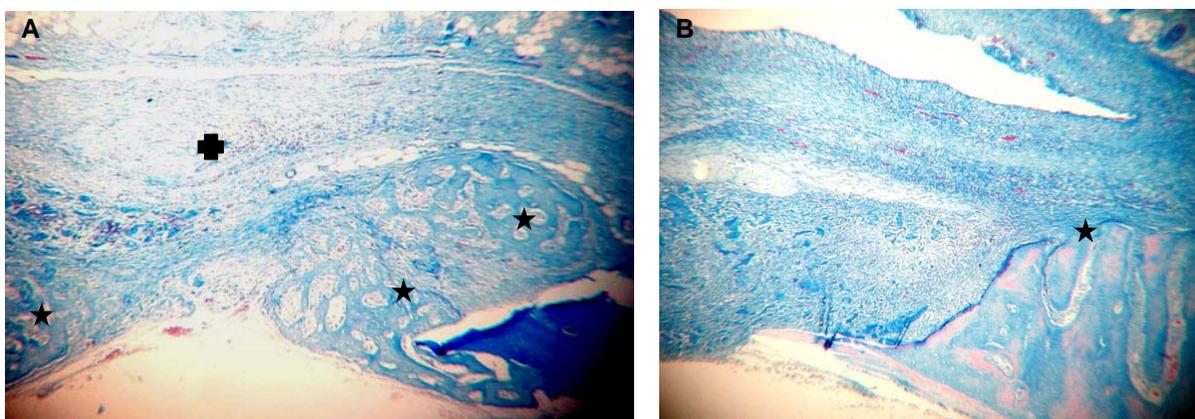


Figure 12. Berge de sites expérimental (A) et témoin (B) à J15 (grossissement x63).

Après 30 jours de cicatrisation (J30)

Les sites témoins retrouvent une épaisseur normale. La lésion est occupée par un tissu conjonctif fibreux, peu cohésif au niveau de la jonction éponge /périoste et non organisé. Du collagène reste visible au centre et un début de néo-formation osseuse (★ Figure 13) est observé au niveau des berges. Les sites expérimentaux ont une épaisseur plus fine dans l'ensemble. Des traces de néoformation osseuse sont visibles près des berges, mais la lésion est occupée par un tissu conjonctif fibreux. L'éponge semble quasiment résorbée.

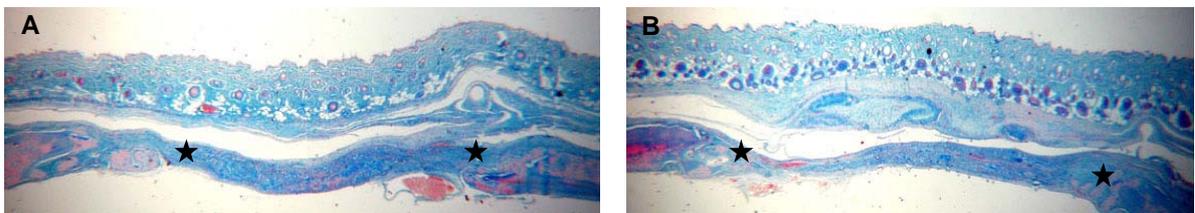


Figure 13. Coupes de sites expérimental (A) et témoin (B) à J30 (grossissement x 25)

À 60 jours post opératoire (J60)

Les sites témoins présentent toujours une épaisseur normale et montrent une cicatrisation harmonieuse des tissus mous, notamment du périoste. La régénération osseuse reste très limitée et située près des berges de la trépanation et la lésion est occupée par un tissu conjonctif fibreux. Le collagène de l'éponge n'est plus identifiable. Les sites expérimentaux montrent une épaisseur globale moindre. Si les berges de la lésion montrent une néo-formation osseuse limitée, on n'obtient pas de cicatrisation osseuse de la trépanation, mais une fine couche de tissu conjonctif fibreux (Figure 14).

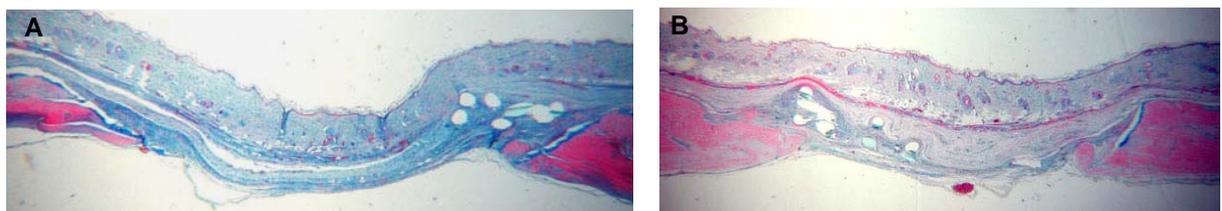


Figure 14. Coupes de sites expérimental (A) et témoin (B) à J60 (grossissement x 25)

1.4 DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le LPA étant un acide gras produit de façon autogène, il n'a posé aucun problème de tolérance tant sur le plan local que général. Les éponges de collagène entraînent un épaissement global de la coupe à 10 jours qui tend ensuite à disparaître à partir de 30 jours avec la résorption complète de l'éponge.

Le résultat le plus marquant de cette expérimentation porte sur un seul animal sacrifié 15 jours après la chirurgie. Le site opéré montre une régénération osseuse massive qui contraste fortement avec les sites témoins. Ce fait serait en accord avec les études menées sur l'action du LPA sur les phases précoces de l'ostéogenèse (Dziak *et al.* 2003). Cependant ce résultat très positif n'est que faiblement corroboré par le deuxième animal sacrifié à 15 jours post-opératoire et, en outre, n'est pas suivi sur les sites opératoires à 30 et 60 jours de cicatrisation.

Aucune différence entre les sites témoins et les sites expérimentaux n'a été observée au niveau de la néo-vascularisation. L'influence du LPA sur l'angiogénèse (Saba 2004) n'a donc pas été vérifiée dans notre étude.

L'éponge de collagène utilisée dans le protocole pourrait avoir eu une action de type régénération osseuse guidée comme une membrane résorbable (Brunel *et al.* 1996). Cela peut être considéré comme un biais du protocole. En effet, l'action du LPA est étudiée en parallèle avec l'action de l'éponge collagène, ce qui peut avoir diminué l'amplitude des différences entre les sites témoins et expérimentaux.

D'autre part, l'administration du LPA imbibant une éponge pose le problème du contrôle du dosage. Si la solution utilisée était de concentration constante (100 μM), la mise à disposition dans l'organisme du LPA pouvait varier. Suite à l'intervention chirurgicale créant la lésion osseuse, le processus de cicatrisation osseuse dépend de la mobilité des cellules réparatrices sur le site (Albrektsson 2001). C'est à cette étape que le LPA est, par hypothèse, supposé intervenir

(Saba 2004, Sturm *et al.* 1999). Or les éponges de collagène étaient découpées approximativement, elles n'étaient donc pas de dimensions constantes.

En outre, les tissus mous étant rabattus sur le site pour obtenir sa fermeture hermétique, l'éponge a pu subir une compression variable lors de la phase des sutures en fonction de son volume et de la tension des tissus. Enfin, le site est envahi par les fluides tissulaires et il est donc difficile, avec le LPA en solution, de garantir une concentration moléculaire sur site. Il est ainsi possible qu'un saignement persistant, même minime cliniquement, ait pu empêcher l'action du LPA sur les cellules avec l'intensité recherchée.

Il est donc difficile d'analyser ces résultats hétérogènes et l'étonnante image de néoformation osseuse observée demanderait à être confirmée par un autre protocole expérimental bénéficiant d'un échantillon plus important. En outre, l'analyse comparative serait plus fiable en utilisant des témoins positifs avec, par exemple, un matériau de comblement osseux déjà utilisé cliniquement.

Nous suggérons enfin l'utilisation d'un moyen de dépose du LPA sur site de type gel afin d'éviter l'effet membrane sélective et afin de garantir la stabilité et la précision dans le positionnement du produit. D'ailleurs, récemment, Mansell *et al.* ont pu montrer l'intérêt du LPA pour la maturation d'ostéoblastes humains en fixant les molécules de LPA à la surface d'implants en titane. Leur technique permet d'assurer la présence d'une concentration efficace de LPA sur site et a mis en évidence l'intérêt du LPA dans la différenciation terminale ostéoblastique (Mansell *et al.* 2012).

II. La Ghrelina différencie les ostéoblastes humains via la voie de signalisation Gi / AMPc.

2.1 OBJECTIF

Comme nous l'avons introduit précédemment, la ghrelina joue clairement un rôle dans le métabolisme osseux. Cependant, les résultats publiés jusqu'à maintenant restent parcellaires et l'action exacte de la ghrelina sur les cellules osseuses, notamment chez l'Homme, reste à préciser. Notre laboratoire travaille étroitement avec le service d'endocrinologie pédiatrique de l'Hôpital des enfants de Toulouse qui est référent pour le syndrome de Prader-Willi. L'hyperghrelinémie associée à des désordres osseux qui ont été constatés cliniquement pour ce syndrome et pour la scoliose idiopathique de l'adolescent a conduit notre équipe à s'intéresser à l'action de la ghrelina sur le tissu osseux. Des expérimentations préliminaires ont notamment mis en évidence des différences de réaction à la stimulation par la ghrelina entre des ostéoblastes issus de patients contrôles et des ostéoblastes issus de patientes présentant une scoliose idiopathique de l'adolescent (résultats non publiés).

L'objectif de notre travail était donc de préciser l'action cellulaire de la ghrelina lors de la différenciation des ostéoblastes humains, notamment via son récepteur à 7 domaines transmembranaires, le GHS-R type 1a. Nous avons choisi de réaliser ces expérimentations sur des lignées d'ostéoblastes humains pour des facilités de culture, mais également pour avoir une idée plus précise de l'action de la ghrelina chez l'Homme sur le plan fondamental avant d'investiguer son rôle dans les pathologies précitées sur des ostéoblastes de patients.

2.2 PUBLICATION

Soumise à la revue "Bone"

Ghrelin differentiates human osteoblasts via the Gi/cAMP pathway

Original study

Authors' names and affiliations:

Ronan Barré ^{a,b}, Nicolas Beton^a, Aurélie Batut ^a, Isabelle Gennero^{a,c,d} and Jean-Pierre Salles ^{a,c}

^a *INSERM, UMR 1043, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Université Paul Sabatier, Hôpital Purpan, CHU de Toulouse 31059 Toulouse cedex 9, France*

^b *Faculté de Chirurgie Dentaire, Université Paul Sabatier, 3 chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse cedex, France*

^c *Unité d'Endocrinologie Maladies Osseuses, Hôpital des Enfants, CHU Toulouse, 31059 Toulouse cedex 9, France*

^d *Institut Fédératif de Biologie, laboratoire de biochimie, CHU de Toulouse, 31059 Toulouse cedex 9, France*

Funding sources:

This work was made possible by grants from the French Program of Hospital Clinical Research (PHRC) from Toulouse University Hospital and by grants from IPSEN Beaufour and Sandoz France to J.P. Salles.

Author's email addresses:

Ronan Barré: ronan.barre@gmail.com

Nicolas Béton: nicolas.beton@inserm.fr

Aurélie Batut: aurelie.batut@inserm.fr

Isabelle Gennero: gennero.i@chu-toulouse.fr

Jean-Pierre Salles: jpsalles@toulouse.inserm.fr

Corresponding author:

Pr J.P. Salles, INSERM UMR 1043 (CPTP), TSA 70034 31059 Toulouse cedex 9 France.

Tel : +33 (0) 5 34558555 Fax : +33 (0) 5 34558558

e-mail: jpsalles@toulouse.inserm.fr

Conflict of interest: The authors have no conflict of interest.

Abstract

Ghrelin is a peptidic hormone secreted in the stomach, which stimulates growth hormone release and food intake. It is also known to have an effect on bone metabolism. The ghrelin specific receptor, GHS-R1a, belongs to the G protein coupled receptors (GPCRs) and its downstream pathways remain unclear in osteoblasts. We attempted to clarify the way ghrelin acts on osteoblasts by studying two human osteosarcoma cell lines, MG63 and SaOs, previously described as a préosteoblastic and a osteoblastic cell line. Ghrelin stimulates the mineralization and alcalin phosphatase activity of osteoblastic cells but not of the preosteoblastic cells. Ghrelin decreases cAMP content of osteoblastic cells but increase it in preosteoblastic cells. The inhibiting effect of ghrelin on osteoblastic cells is reversed by PTX, a Gi inhibitor, or by GHRP6 [D-Lys], a GHS-R1a inhibitor. Our results show that ghrelin elicits a Gi/cAMP pathway in differentiated osteoblasts only. It is suggested that optimal tuning of the Gi pathway by ghrelin and its receptor may increase the differentiation of bone cells. These results emphasize the potential role of ghrelin and GHS-R1a in the regulation of bone formation.

Highlights

- Ghrelin and the GHS-R1a receptor are involved in osteoblastic proliferation and differentiation
- The mechanism involved in osteoblastic differentiation induced by ghrelin is largely unknown
- Gi activation is potentially implicated in osteoblastic differentiation
- We demonstrate that ghrelin and GHS-R1a elicit a Gi/cAMP pathway in differentiated osteoblastic cells
- This pathway is involved in osteoblastic differentiation
- Ghrelin increases GHS-R1a expression in differentiating cells

Keywords

Ghrelin, osteoblast, differentiation, G proteins, osteoporosis

Introduction

Several hormones contribute to the relationship between fat and bone. Among them, ghrelin, discovered in 1999 [1], is a 28 amino acid acylated peptide mainly secreted by neuroendocrine cells in the stomach, and which has been reported to participate in the release of growth hormone and food intake. The ghrelin receptor, known as the growth hormone secretagogue receptor GHS-R1a, is found in many organs, its wide distribution indicating that ghrelin may have a variety of regulatory functions both in the brain and peripheral tissues [2]. Various studies have observed an effect of ghrelin on the proliferation or differentiation of osteoblasts [3-8] which suggests its involvement in the direct regulation of bone growth with potential consequences in disease [9-11].

The effect of ghrelin on the osteoblast is thought to be essentially conveyed by activation of its cognate receptor GHS-R1a, which belongs to the family of G protein-coupled receptors (GPCRs). Considerable attention has been paid to the involvement of GPCRs in the regulation of osteoblastic proliferation and differentiation with regard to the Gs and Gi pathways linked to cyclic AMP (cAMP). Although the best known signaling pathway downstream of GHS-R1a in somatotrophic pituitary cells involves the Gq11-protein with phospholipase C activation triggering calcium release, alternatives signaling may occur [12]. Activation of the Gs/cAMP pathway by GHS-R1a has been demonstrated as a ligand-independent constitutive signaling pathway [13]. On the other hand, heterodimerization of GHS-R1a with other receptors may explain ghrelin-mediated Gs activation and cAMP increase in chondrocytes [12, 14]. However, a Gi-mediated pathway elicited by ghrelin has also been demonstrated, although the mechanism involved is unclear [15, 16]. In bone pathophysiology the current view is that sustained overexpression of the Gs pathway increases bone formation, however the bone produced is immature [17-22]. Conversely,

overexpression of the Gi pathway decreases bone mass [23] while suppression of the pathway increases it [24].

Osteoblasts express several receptors that activate the Gs pathway, among them the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related receptor PTHR1. Another range of ligands elicit Gi-dependent responses from osteoblastic cells through activation of the serotonin receptor Htr1b, the melatonin receptor M2R or the lysophosphatidic acid receptor LPA₁. While Htr1b deficiency is associated with an increase of bone mass [25], we recently reported that LPA₁ invalidation is responsible for osteoporosis [26]. Therefore the role of the Gi pathway in osteogenesis is far from clear. It is nevertheless suggested that cross-talk between Gs and Gi pathways is necessary for optimal control of osteogenesis [27, 28].

Thus ghrelin, seemingly involved in osteogenesis through action on osteoblasts, may theoretically elicit both Gs and Gi pathways through activation of GHS-R1a. We therefore tried to clarify the effect of ghrelin on differentiating osteoblastic cells. We used the two osteoblastic cell lines MG63 and SaOs at different steps of differentiation. The results suggest that ghrelin elicits a Gi/cAMP pathway in differentiated osteoblasts. It is suggested that optimal tuning of the Gi pathway by ghrelin and its receptor may increase the differentiation of bone cells. These results emphasize the potential role of ghrelin and GHS-R1a in the regulation of bone formation.

Materials and methods

Cell culture

We used two human osteosarcoma cell lines, SaOs-2 and MG63. Cells were cultured in DMEM medium supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS) and penicillin/streptomycin (10,000 IU/ml and 10,000 g/ml respectively) (reagents from Gibco, Invitrogen Corporation, Cergy, France). For experiments, cells were seeded in 6 or 12-well plates at a density of 10^4 cells.cm⁻² for MG63, and 2×10^4 cells.cm⁻² for SaOs in order to obtain similar confluence before experiments after 48 h. For differentiation, MG63 cells were cultured for 3 weeks in osteogenic medium (OM) containing 10 nM dexamethasone and 100 μ M ascorbic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), with FCS concentration lowered to 5% (v/v) in DMEM. The cells obtained were termed differentiated MG63 cells (dMG63). For mineralization assay, medium was supplemented with 10mM inorganic phosphate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). All cultures were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂.

Materials

Synthetic acylated ghrelin was purchased from PolyPeptide Group (Strasbourg, France). Polyclonal anti-GHS-R1a antibody was purchased from Alpha Diagnostic International (San Antonio, TX). Polyclonal anti-RUNX2 and anti-actin antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Unless otherwise indicated, all other reagents were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Alkaline phosphatase (ALP) activity and DNA content

After culture as described in the figure legends, cells were washed in PBS, scraped with 0.1% NP40 (v/v) in TBS and sonicated for 10 sec. ALP activity was assayed in cell homogenates according to the modified method of Bessey et al. [29, 30] in a 2-amino-2-methyl-1-propanol alkaline (AMP) - HCl buffer (pH=10.3 at 25°C) supplemented with 1 mM *para*-nitrophenylphosphate (pNP) as substrate and 5 mM MgCl₂. The mixture was incubated for 5 min at 22°C, and the reaction stopped with 0.1N NaOH. Hydrolysis of pNP was monitored as change in A₄₀₅ in a spectrometer (Varioskan Flash, Thermo scientific). A standard curve was constructed with increasing concentrations of pNP. The experimental values were normalized for the DNA content of homogenates. The DNA content of cells was measured using the Picogreen® assay according to the manufacturer's instructions (Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad, CA). ALP activity was expressed as nmole *p*-nitrophenol.min⁻¹.ng⁻¹ DNA.

Adenylyl cyclase activity assay

Cells were seeded in 12-well plates (5 × 10⁵ cells per well) and cultured for 48 h in DMEM with FCS 10% v/v. The medium was rinsed and the cells further incubated with the vehicle alone (DMSO 2% v/v) or 10⁻⁵ M forskolin for 5 min in order to increase cAMP production before ghrelin was added or not. When used, 34 μM adenylyl cyclase inhibitor pertussis toxin (PTX) was added 12 h before experiments. When used, 1 μM GHS-R1a inhibitor GHRP6 [D-Lys] was added 2 h before experiments. After 10 min incubation, the medium was removed and the cells were lysed using the buffer of the enzyme immunoassay kit for cAMP (Amersham-Pharmacia Biosciences, Mississauga, ON, Canada). The cAMP content was

measured in 200 μ L aliquots of the supernatant using the enzyme immunoassay according to the manufacturer's instructions.

Mineralization assay

Calcium deposits from cultured cells were stained with 40 mM AR solution, pH=4.2, as described previously [31]. Briefly, at day 21 the medium was removed and wells rinsed twice with phosphate buffer saline (PBS). Cells were fixed in 70% ethanol/distilled water (v/v) for 1 h at 4°C. AR solution was added to each well for 5 min and rinsed 7 times in order to remove non-specific staining.

Western blotting

The cells were rinsed twice with PBS and harvested in trypsin EDTA solution. Cell counting was performed in order to normalize the cell extracts. Cell extracts were put in lysis buffer containing 25 mM Tris, pH 7.4, 50 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 5% glycerol, 0.5% Triton X-100, 20 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄, and protease inhibitors. The cell lysates were cleared by centrifugation and aliquots were diluted in Laemmli sample buffer, boiled, and processed for immunoblotting using a standard procedure. The samples were subjected to 10% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) and then transferred to nitrocellulose membranes. Non-specific binding sites were blocked by immersing the membranes in 5% skim milk in PBS for 1 h at room temperature, and the membranes were then washed five times with PBS containing 0.1% Tween-20. The membranes were incubated with the primary antibody in PBS containing 0.1% Tween-20 overnight at 4°C (concentration). After washing the membranes five times, the secondary antibody was added.

Immunopositive bands were detected by chemiluminescence using ECL reagent (Chemiluminescent Peroxidase Substrate-3, Sigma, St. Louis, MO) and exposure to a radiofilm (Kodak Biomax Light film, Carestream Health).

Real-time PCR

24 h after ghrelin stimulation, SaOs cells were harvested and total RNA was isolated using Trizol reagent (Sigma, St. Louis, MO) according to the manufacturer's protocol. Total RNA concentration and purity were determined by reading the absorbance at 260 / 280 nm in an UV spectrophotometer (BioPhotometer plus, Eppendorf). 1 µg of total RNA was reverse transcribed to cDNA using M-MLV (Promega, USA) and 25 µM Hexamers (Fermentas, St Leon-Rot, Germany), a 20 µl final reaction, according to the manufacturer's instructions. Quantitative PCR was performed using LightCycler 480 DNA SYBR Green I Master reaction mix (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). In order to detect GHSR-1a expression, forward 5' - TGCTGGCTGTAGTGGTGTTC-3' and reverse 5'-AGGACAAAGGACACGAGGTTGC-3' primers were designed using the QuantPrime web application [32]. The amplification program began with initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 40 cycles at 95°C for 10 sec and 60°C for 40 sec using the LightCycler® 480 System (Roche diagnostics, Mannheim, Germany). The RT-PCR results were analyzed using sequence detection software from Applied Biosystems (Carlsbad, CA) and the relative amount of target gene transcript was normalized to the amount of Rpl 27 mRNA control transcript. The data represent results of RNA analyses from 3 different independent experiments. The data shown represent the relative mRNA levels calculated as $2^{-\Delta Ct} \times 10^6$ where $\Delta Ct = Ct \text{ gene of interest} - Ct \text{ Rpl27}$.

Statistical analysis

Results are expressed as means \pm (SD). Groups were compared using Student's t test or Mann–Whitney analysis as appropriate. A *p* value <0.05 was considered statistically significant and marked with *. ** correspond to a *p* value <0.01 .

Results

Ghrelin stimulates the differentiation of SaOs osteoblastic cells

SaOs cells were cultured for 21 days in DMEM with or without ghrelin, or with osteogenic medium (OM) as a differentiating control (see Methods). Ghrelin stimulated the formation of calcified nodules of SaOs cells in a dose-dependent manner (Fig. 1A). Ghrelin 10^{-7} M elicited an effect similar to OM on mineralization. ALP activity of cultured cells was also tested after 7 days of culture with the medium changed and ghrelin stimulation renewed every 2 days. Ghrelin demonstrated a significant dose-dependent stimulatory effect on ALP activity of SaOs cells (Fig. 1B). Furthermore, expression of RUNX2, known as a major marker of osteoblastic differentiation, was tested. After 2 and 4 days of culture, ghrelin increased the expression of RUNX2 by SaOs cells (Fig. 1C). The DNA content of SaOs cells was evaluated after 4 or 7 of culture, with or without ghrelin. Ghrelin decreased the DNA content of SaOs cells (Fig. 1D). The effect of ghrelin therefore appeared to be double: stimulating the differentiation of SaOs cells and slightly decreasing their proliferation.

Ghrelin decreases the cAMP level of SaOs cells, which depends on the Gi pathway

It is well known that the cAMP level of osteoblastic cells controls their ability to differentiate. Sustained cAMP production results in immature osteoblastic features. The effects of ghrelin are mainly relayed by G protein-coupled receptors (GPCRs), which signal through a number of pathways, namely Gs and Gi which modulate the intracellular cAMP level. To further understand the action of ghrelin on human osteoblasts, we investigated its effect on the cAMP content of SaOs cells. Ghrelin significantly decreased in a dose-dependent manner the cAMP content of SaOs cells and also the cAMP content of SaOs cells previously stimulated by forskolin (see Methods) (Fig. 2A). Administration of pertussis toxin (PTX), a known Gi inhibitor, to SaOs cells 12 h prior to ghrelin stimulation cancelled the inhibitory effect of ghrelin on forskolin-induced cAMP level (Fig. 2B). Finally, RUNX2 expression induced by ghrelin in SaOs cells was also reduced in PTX-treated cells (Fig. 2C).

Effect of ghrelin depends on the state of osteoblastic differentiation

We further hypothesized that the effect of ghrelin is dependent on the state of differentiation of osteoblastic cells. SaOs cells are usually considered differentiated cells, while MG63 cells are considered a preosteoblastic cell line. Therefore, MG63 cells provide an accurate model for testing the hypothesis of a differential effect of ghrelin depending on the state of osteoblastic differentiation. Experiments were thus performed with MG63 cells maintained in basic medium and with MG63 cells (dMG63) previously differentiated in OM for 21 days. MG63 and dMG63 cells were then cultured for an additional 21 days with or without ghrelin, with OM as control. As shown in Fig. 3A with alizarin red stain, OM similarly differentiated MG63 and dMG63 cells. However, ghrelin stimulated the formation of calcified nodules in dMG63 cells, but not in MG63 cells (Fig. 3A). DNA content was increased by ghrelin after 4 and 7 days of culture in MG63 cells, but decreased in dMG63

cells (Fig. 3B). It was noteworthy that similarly to the results found in SaOs cells, ghrelin decreased the cAMP content of forskolin-stimulated dMG63 cells, while it increased cAMP content in MG63 cells (Fig. 3C). These results strongly suggested that the effect of ghrelin was dependent on the state of differentiation of osteoblastic cells, with ghrelin stimulating the proliferation of undifferentiated cells as well as the differentiation of more differentiated cells. Moreover, these opposite effects of ghrelin seemed related to opposite signaling pathways elicited, Gs and Gi respectively.

Effect of ghrelin on osteoblastic cells depends on the GHS-R1a receptor

GHS-R1a, a GPCR receptor, is a characterized ghrelin receptor [2, 12]. We used GHRP6 [D-Lys], a specific inhibitor of GHS-R1a, to clarify the effect of ghrelin on osteoblastic differentiation. The inhibiting effect of ghrelin on the forskolin-stimulated cAMP content was abolished in SaOs treated with GHRP6 [D-Lys] prior to ghrelin stimulation (Fig. 4A). Ghrelin lost its lowering effect on cAMP content in forskolin-stimulated dMG63 when the cells were previously blocked by GHRP6 [D-Lys] (Fig. 4B). Conversely, the forskolin-induced cAMP level of MG63 was higher under ghrelin, with no influence of GHRP6 [D-Lys]. We then tested the expression of GHS-R1a by SaOS and MG63 cells. GHS-R1a expression was higher in dMG63 and SaOs than in undifferentiated MG63 cells. Moreover, GHS-R1a expression increased along the osteoblastic differentiation of MG63 cells towards dMG63 cells (Fig. 4C). Finally, we found significantly increased expression of GHS-R1a in SaOs cells subjected to 24 h stimulation by ghrelin (Fig. 4D). Overall, these results suggest that ghrelin stimulates osteoblastic differentiation in a way that depends on Gi and cAMP lowering downstream of GHS-R1a activation. Increased expression of GHS-R1 during osteoblastic differentiation under ghrelin suggests an amplification process by ghrelin itself.

Discussion

Several reports have suggested that ghrelin directly influences osteogenesis by inducing the proliferation and differentiation of osteoblasts [3-8]. The results presented here suggest that the effect of ghrelin on osteoblasts is highly dependent on the state of differentiation of these cells. While ghrelin slightly stimulated proliferation of undifferentiated MG63 cells, it stimulated differentiation and increased mineralization of more differentiated cells: MG63 previously subjected to osteogenic medium or SaOS cells. We also observed that the effect of ghrelin was to slightly increase cAMP level in undifferentiated cells, as well as to clearly decrease it in more differentiated cells. The cAMP-lowering effect of ghrelin was blocked by PTX and GHRP6 [D-Lys], and therefore depends on Gi and GHS-R1a activation. These results suggest a modification of the intracellular signaling occurring during the differentiation of osteoblastic cells. Nevertheless, both undifferentiated and differentiated cells expressed GHS-R1a, the prominent putative receptor of ghrelin. We observed, however, an increased expression of GHS-R1a during the differentiation of osteoblastic cells. Finally, cells subjected to ghrelin increased GHS-R1a expression of SaOs cells. It is therefore suggested that ghrelin may progressively uncover a Gi pathway during the progression of osteoblastic differentiation, along with increased GHS-R1a expression, both contributing to fully differentiate these cells towards mineralization.

In various reports ghrelin has been shown to be mitogenic [4, 6, 33] depending on the GHS-R1a receptor [6, 33]. Wang et al. attributed the proliferation effect of ghrelin to a NO/cGMP pathway blocked by the GHRP6 [D-Lys] antagonist of GHS-R1a [33]. In our study, ghrelin only slightly increased the cAMP content of undifferentiated MG63 cells, which suggests that ghrelin/GHS-R1a may, like PTH/PTHr1, use the cAMP pathway to induce mitogenesis of preosteoblasts. However, this effect was modest and not clearly

blocked by the GHRP6 [D-Lys] inhibitor. The cAMP dependence of the proliferation induced by ghrelin in osteoblastic cells has, to the best of our knowledge, not been extensively examined and it remains therefore relatively uncertain which pathway is used by ghrelin to induce the proliferation of undifferentiated osteoblasts.

We mainly concentrated on the differentiating effect of ghrelin, which, in our study, appeared dependent on the Gi pathway, with a decrease of cAMP level induced in forskolin-stimulated SaOS cells. In accordance with this finding, the induced expression of RUNX2 under ghrelin was decreased by PTX (Fig. 2C). It was noteworthy that the behavior of MG63 under ghrelin was modified following incubation in the osteogenic medium. Unlike undifferentiated cells, differentiated MG63 cells acquired a Gi pathway with decreased cAMP level when stimulated with forskolin. Therefore, SaOs and differentiated MG63 express the Gi pathway, which, when blocked, impairs the differentiation under ghrelin, with lower RUNX2 expression and decreased mineralization. This is in good agreement with the effect of the sustained Gs activity in osteoblastic cells which leads to production of immature bone in various models and in disorders such as fibrous dysplasia/McCune-Albright syndrome [18, 22]. It also emphasizes the potential role of ghrelin/GHS-R1a in eliciting the Gi pathway in osteoblasts, beside other agonists and receptors such as serotonin/Htr1b, the lysophosphatidic receptor LPA₁ or the melatonin receptor MT2R [25, 26, 34]. Given that the effect of ghrelin on the Gi pathway was blocked by the GHS-R1a inhibitor GHRP6 [D-Lys], we suggest that GHS-R1a is involved in the osteoblastic differentiation induced by ghrelin. As stated above, our results also suggest a modification of the pathway elicited by ghrelin during osteoblastic differentiation, with a shift from the Gs to the Gi pathway from undifferentiated to differentiated cells.

Strikingly, the expression of GHS-R1a increased when MG63 cells were driven towards a more differentiated state (Fig. 4C). In addition, GHS-R1a was also dramatically

increased by ghrelin (Fig. 4D). Thus, such increased expression of GHS-R1a may contribute to a modification of the intracellular pathways elicited. One attractive hypothesis is that heterodimerization occurs in differentiated osteoblasts [12], leading to a change of the signaling pathway when the GHS-R1a receptor becomes coupled to another prominently Gi-stimulating receptor. Indeed, to date heterodimerization of GHS-R1a is mainly supposed to induce Gs signaling, as recently demonstrated with the melanocortin-3 receptor [12, 35]. However, Gi signaling with decreased cAMP has been recently observed in smooth muscle cells and islet b-cells [15]. Thus, hypothetically, heterodimerization could occur in osteoblasts with LPA₁, MT2R or other receptors which are emblematic Gi-coupled receptors expressed by differentiated osteoblasts. Such phenomena could be amplified by adjacent conditions such as estrogen cross-talk, as suggested for MT2R [28]. In this respect, it is worth noting that ghrelin action is usually linked to pubertal status.

In conclusion, the effect of ghrelin and GHS-R1a on osteoblasts seems complex, depending on their state of differentiation. Ghrelin and GHS-R1a can contribute to osteoblast proliferation when these cells are undifferentiated, as well as to their differentiation when they are more differentiated. Increasing the cAMP tone and lowering RUNX2 expression of undifferentiated osteoblasts may contribute to maintaining them in a proliferating state. Decreasing the cAMP level in Gi dependent manner may allow osteoblast differentiation to progress. We suggest that ghrelin may have a significant role within the concert of ligands eliciting the Gi pathway which seems important to allow the full differentiation of osteoblasts. Its role may be amplified during certain phases of growth or development such as the pubertal spurt.

References

- [1] Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656–60.
- [2] Albarran-Zeckler RG, Sun Y, Smith RG. Physiological roles revealed by ghrelin and ghrelin receptor deficient mice. *Peptides* 2011; 32: 2229–35.
- [3] Belloni AS, Macchi C, Rebuffat P, Conconi MT, Malendowicz LK, Parnigotto PP, Nussdorfer GG. Effect of ghrelin on the apoptotic deletion rate of different types of cells cultured in vitro. *Int J Mol Med* 2004; 14: 165–7.
- [4] Costa JL, Naot D, Lin JM, Watson M, Callon KE, Reid IR, Grey AB, Cornish J. Ghrelin is an osteoblast mitogen and increases osteoclastic bone resorption in vitro. *Int J Pept* 2011; 2011: 605193.
- [5] Delhanty PJ, van der Eerden BC, van der Velde M, Gauna C, Pols HA, Jahr H, Chiba H, van der Lely AJ, van Leeuwen JP. Ghrelin and unacylated ghrelin stimulate human osteoblast growth via mitogen-activated protein kinase (MAPK)/phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathways in the absence of GHS-R1a. *J Endocrinol* 2006; 188: 37–47.
- [6] Fukushima N, Hanada R, Teranishi H, Fukue Y, Tachibana T, Ishikawa H, Takeda S, Takeuchi Y, Fukumoto S, Kangawa K, Nagata K, Kojima M. Ghrelin directly regulates bone formation. *J Bone Miner Res* 2005; 20: 790–8.
- [7] Kim SW, Her SJ, Park SJ, Kim D, Park KS, Lee HK, Han BH, Kim MS, Shin CS, Kim SY. Ghrelin stimulates proliferation and differentiation and inhibits apoptosis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Bone* 2005; 37: 359–69.
- [8] Maccarinelli G, Sibilina V, Torsello A, Raimondo F, Pitto M, Giustina A, Netti C, Cocchi D. Ghrelin regulates proliferation and differentiation of osteoblastic cells. *J Endocrinol* 2005; 184: 249–56.

- [9] Caffarelli C, Gonnelli S, Tanzilli L, Hayek J, Vichi V, Franci MB, Lucani B, Nuti R. The relationship between serum ghrelin and body composition with bone mineral density and QUS parameters in subjects with Rett syndrome. *Bone* 2012; 50: 830–5.
- [10] Misra M, Miller KK, Stewart V, Hunter E, Kuo K, Herzog DB, Klibanski A. Ghrelin and bone metabolism in adolescent girls with anorexia nervosa and healthy adolescents. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 5082–7.
- [11] Napoli N, Pedone C, Pozzilli P, Lauretani F, Bandinelli S, Ferrucci L, Incalzi RA. Effect of ghrelin on bone mass density: the InChianti study. *Bone* 2011; 49: 257–63.
- [12] Schellekens H, Dinan TG, Cryan JF. Lean mean fat reducing "ghrelin" machine: hypothalamic ghrelin and ghrelin receptors as therapeutic targets in obesity. *Neuropharmacology* 2010; 58: 2–16.
- [13] Holst B, Cygankiewicz A, Jensen TH, Ankersen M, Schwartz TW. High constitutive signaling of the ghrelin receptor--identification of a potent inverse agonist. *Mol Endocrinol* 2003; 17: 2201–10.
- [14] Caminos JE, Gualillo O, Lago F, Otero M, Blanco M, Gallego R, Garcia-Caballero T, Goldring MB, Casanueva FF, Gomez-Reino JJ, Dieguez C. The endogenous growth hormone secretagogue (ghrelin) is synthesized and secreted by chondrocytes. *Endocrinology* 2005; 146: 1285–92.
- [15] Dezaki K, Damdindorj B, Sone H, Dyachok O, Tengholm A, Gylfe E, Kurashina T, Yoshida M, Kakei M, Yada T. Ghrelin attenuates cAMP-PKA signaling to evoke insulinostatic cascade in islet beta-cells. *Diabetes* 2011; 60: 2315–24.
- [16] Mladenov MI, Hristov KL, Dimitrova DZ, Schubert R, Lubomirov LT, Gjorgoski IK, Duridanova DB, Gagov HS. Ghrelin signalling in guinea-pig femoral artery smooth muscle cells. *Acta Physiol (Oxf)* 2008; 194: 195–206.
- [17] Sakamoto A, Chen M, Nakamura T, Xie T, Karsenty G, Weinstein LS. Deficiency of

the G-protein alpha-subunit G(s)alpha in osteoblasts leads to differential effects on trabecular and cortical bone. *J Biol Chem* 2005; 280: 21369–75.

- [18] Wu JY, Aarnisalo P, Bastepe M, Sinha P, Fulzele K, Selig MK, Chen M, Poulton IJ, Purton LE, Sims NA, Weinstein LS, Kronenberg HM. Gsalpha enhances commitment of mesenchymal progenitors to the osteoblast lineage but restrains osteoblast differentiation in mice. *J Clin Invest* 2011; 121: 3492–504.
- [19] Hsiao EC, Boudignon BM, Chang WC, Bencsik M, Peng J, Nguyen TD, Manalac C, Halloran BP, Conklin BR, Nissenson RA. Osteoblast expression of an engineered Gs-coupled receptor dramatically increases bone mass. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 1209–14.
- [20] Hsiao EC, Boudignon BM, Halloran BP, Nissenson RA, Conklin BR. Gs G protein-coupled receptor signaling in osteoblasts elicits age-dependent effects on bone formation. *J Bone Miner Res* 25: 584–93.
- [21] Hsiao EC, Millard SM, Louie A, Huang Y, Conklin BR, Nissenson RA. Ligand-mediated activation of an engineered gs g protein-coupled receptor in osteoblasts increases trabecular bone formation. *Mol Endocrinol* 2010; 24: 621–31.
- [22] Kazakia GJ, Speer D, Shanbhag S, Majumdar S, Conklin BR, Nissenson RA, Hsiao EC. Mineral composition is altered by osteoblast expression of an engineered G(s)-coupled receptor. *Calcif Tissue Int* 2011; 89: 10–20.
- [23] Peng J, Bencsik M, Louie A, Lu W, Millard S, Nguyen P, Burghardt A, Majumdar S, Wronski TJ, Halloran B, Conklin BR, Nissenson RA. Conditional expression of a Gi-coupled receptor in osteoblasts results in trabecular osteopenia. *Endocrinology* 2008; 149: 1329–37.
- [24] Millard SM, Louie AM, Wattanachanya L, Wronski TJ, Conklin BR, Nissenson RA. Blockade of receptor-activated G(i) signaling in osteoblasts in vivo leads to site-specific

- increases in cortical and cancellous bone formation. *J Bone Miner Res* 2011; 26: 822–32.
- [25] Yadav VK, Ryu JH, Suda N, Tanaka KF, Gingrich JA, Schutz G, Glorieux FH, Chiang CY, Zajac JD, Insogna KL, Mann JJ, Hen R, Ducy P, Karsenty G. Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. *Cell* 2008; 135: 825–37.
- [26] Gennero I, Laurencin-Dalicieux S, Conte-Auriol F, Briand-Mesange F, Laurencin D, Rue J, Beton N, Malet N, Mus M, Tokumura A, Bourin P, Vico L, Brunel G, Oreffo RO, Chun J, Salles JP. Absence of the lysophosphatidic acid receptor LPA1 results in abnormal bone development and decreased bone mass. *Bone* 2011; 49: 395–403.
- [27] Azeddine B, Letellier K, Wang da S, Moldovan F, Moreau A. Molecular determinants of melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis. *Clin Orthop Relat Res* 2007; 462: 45–52.
- [28] Letellier K, Azeddine B, Parent S, Labelle H, Rompre PH, Moreau A, Moldovan F. Estrogen cross-talk with the melatonin signaling pathway in human osteoblasts derived from adolescent idiopathic scoliosis patients. *J Pineal Res* 2008; 45: 383–93.
- [29] Bessey OA, Lowry OH, Brock MJ. A method for the rapid determination of alkaline phosphates with five cubic millimeters of serum. *J Biol Chem* 1946; 164: 321–9.
- [30] Sloopweg MC, Salles JP, Ohlsson C, de Vries CP, Engelbregt MJ, Netelenbos JC. Growth hormone binds to a single high affinity receptor site on mouse osteoblasts: modulation by retinoic acid and cell differentiation. *J Endocrinol* 1996; 150: 465–72.
- [31] Stanford CM, Jacobson PA, Eanes ED, Lembke LA, Midura RJ. Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblastic cell line (UMR 106-01 BSP). *J Biol Chem* 1995; 270: 9420–8.
- [32] Arvidsson S, Kwasniewski M, Riano-Pachon DM, Mueller-Roeber B. QuantPrime--a flexible tool for reliable high-throughput primer design for quantitative PCR. *BMC*

Bioinformatics 2008; 9: 465.

- [33] Wang DH, Hu YS, Du JJ, Hu YY, Zhong WD, Qin WJ. Ghrelin stimulates proliferation of human osteoblastic TE85 cells via NO/cGMP signaling pathway. *Endocrine* 2009; 35: 112–7.
- [34] Sethi S, Radio NM, Kotlarczyk MP, Chen CT, Wei YH, Jockers R, Witt-Enderby PA. Determination of the minimal melatonin exposure required to induce osteoblast differentiation from human mesenchymal stem cells and these effects on downstream signaling pathways. *J Pineal Res* 2010; 49: 222–38.
- [35] Rediger A, Piechowski CL, Yi CX, Tarnow P, Strotmann R, Gruters A, Krude H, Schoneberg T, Tschop MH, Kleinau G, Biebermann H. Mutually opposite signal modulation by hypothalamic heterodimerization of ghrelin and melanocortin-3 receptors. *J Biol Chem* 2011; 286: 39623–31.

Figure legends

Fig. 1. Ghrelin stimulates osteoblastic differentiation of SaOs cells. (A). SaOs cells were cultured for 21 days in basic medium (BM), BM with ghrelin (10 or 100 nM) or in osteogenic medium (OM). Microscopic observation after staining with alizarin red demonstrated a positive effect of ghrelin on mineralization of SaOs cells. (B). Alkaline phosphatase activity of SaOs cells was tested after 7 days of culture in basic medium (BM), BM with ghrelin (10 or 100 nM) or in osteogenic medium (OM). Alkaline phosphatase activity was normalized for the DNA content of cells (see Materials and methods). The data presented are expressed as percentages of the mean value obtained from cells cultured in BM. Values in the graphs represent means \pm SD resulting from 3 independent experiments. (C). Quantitative expression of RUNX2 by SaOs cells stimulated by ghrelin 100 nM after 2 or 4 days of culture. After harvesting the cells, the volume of extracts was normalized according to the cell number before immunoblotting with specific anti-RUNX2 and anti-actin antibodies. The immunoblots are representative of 3 independent experiments. (D). DNA content of SaOs cells cultured in BM after 4 and 7 days with or without ghrelin 100 nM. The control value (100%) is the value of DNA content in BM without ghrelin. DNA content was lower in cells cultured with 100 nM ghrelin. Values in the graphs represent means \pm SD resulting from 3 independent experiments. Differences were considered statistically significant if $p < 0.05$ using Mann-Whitney analysis.

Fig. 2. Ghrelin decreases cAMP in SaOs cells depending on the Gi pathway. (A). SaOs cells were seeded for 48 h then incubated with the vehicle (DMSO) or with forskolin (10^{-5} M) in order to stimulate cAMP production. Ghrelin (10 or 100 nM) was added for 10 min incubation, then the medium was removed, the cells were lysed and the cAMP

content was measured using an enzyme immunoassay as described in Materials and methods. Values in the graphs represent means \pm SD resulting from 4 independent experiments. Ghrelin decreases basal and forskolin-induced cAMP level of SaOs cells. (B). SaOs cells were incubated in DMEM alone or with the Gi inhibitor pertussis toxin (PTX) 34 μ M, then stimulated with forskolin (10^{-5} M) and ghrelin 100 nM, and cAMP was measured as described above. Values in the graphs represent means \pm SD resulting from 3 independent experiments, expressed as percentages of the control cells cultured in DMEM alone. Ghrelin decreased the cAMP content of SaOs stimulated by forskolin, but not in the presence of PTX. Differences were considered statistically significant if $p < 0.05$ using Mann-Whitney analysis. (C). SaOs cells were cultured in DMEM alone or with PTX 34 μ M, then stimulated or not with ghrelin 100 nM for 48 h. After harvesting the cells, the volume of extracts was normalized according to the cell number before immunoblotting with specific anti-RUNX2 and anti-actin antibodies. The immunoblots are representative of 3 independent experiments. Ghrelin increased RUNX2 expression in SaOs cells, but not when the cells were incubated with PTX.

Fig. 3. Effect of ghrelin depends on the state of osteoblastic differentiation.

(A). MG63 cells or differentiated MG63 cells (dMG63) previously cultured 21 days in osteogenic medium (OM), were cultured for an additional 21 days in BM, BM with ghrelin (10 or 100 nM) or in osteogenic medium (OM). Microscopic observation after staining with alizarin red demonstrated a positive effect of ghrelin on mineralization of dMG63 cells but not of MG63 cells. (B). DNA content of MG63 and dMG63 cells cultured in BM for 4 and 7 days with or without ghrelin 100 nM. The control value (100%) is the value of DNA content in BM without ghrelin. Ghrelin decreases the DNA content of dMG63 cells but increases it in MG63 cells. Values in the graphs

represent means \pm SD resulting from 3 independent experiments. (C). MG63 or dMG63 cells were seeded for 48 h then incubated with the vehicle (DMSO) or with forskolin (10^{-5} M) in order to stimulate cAMP production. Ghrelin (10 or 100 nM) was added for 10 min incubation, then the medium was removed, the cells were lysed and cAMP content was measured using an enzyme immunoassay as described in Materials and methods. Values in the graphs represent means \pm SD resulting from 4 independent experiments. In cells stimulated by forskolin, ghrelin increases the cAMP content of MG63 cells but decreases that of dMG63 cells. (D). MG63 or dMG63 cells were cultured in DMEM alone or with the Gi inhibitor pertussis toxin (PTX) $34\mu\text{M}$, then stimulated or not with ghrelin 100 nM for 48 h. After harvesting the cells, the volume of extracts was normalized according to the cell number before immunoblotting with specific anti-RUNX2 and anti-actin antibodies. The immunoblots are representative of 3 independent experiments. Values in the graphs represent means \pm SD resulting from 3 independent experiments. Ghrelin increases RUNX2 expression in dMG63 cells but decreases it in MG63 cells. Differences were considered statistically significant if $p < 0.05$ using Mann-Whitney analysis.

Fig. 4. Ghrelin increases osteoblastic differentiation depending on the GHSR1a receptor. (A). SaOs cells were seeded for 48 h then incubated with forskolin (10^{-5} M) in order to stimulate tcAMP production, and the GHSR-1a inhibitor (GHRP6 [D-Lys]) $1\mu\text{M}$ was added 2 h before incubation with ghrelin 100 nM. Ghrelin was added for 10 min, then the medium was removed, the cells were lysed and cAMP content was measured using an enzyme immunoassay as described in Materials and methods. Values in the graphs represent means \pm SD resulting from 4 independent experiments. Ghrelin increased cAMP content in forskolin-stimulated SaOs cells previously treated

by GHRP6 [D-Lys]. (B). SaOs, MG63 and dMG63 cells grown in basic medium and MG63 grown in osteogenic medium for 21 days were harvested and the extracts normalized according to the cell number, then immunoblotted with specific anti-GHSR-1a and anti-actin antibodies. Expression of GHSR-1a was higher in dMG63 and SaOS cells than in MG63 cells and increased with osteogenic differentiation of MG63 cells. (C). MG63 or dMG63 cells were seeded for 48 h then incubated with forskolin (10^{-5} M) in order to stimulate cAMP production, and the GHSR-1a inhibitor (GHRP6 [D-Lys]) $1\mu\text{M}$ was added 2 h before incubation with ghrelin 100 nM. Ghrelin was added for 10 min, then the medium was removed and the cells were lysed. The cAMP content was measured using an enzyme immunoassay as described in Materials and methods. Values in the graphs represent means \pm SD resulting from 4 independent experiments. In cells previously treated by GHRP6 [D-Lys], ghrelin increased cAMP content in both MG63 and dMG63 cells. Differences were considered statistically significant if $p < 0.05$ using Mann-Whitney analysis. (D). SaOs cells were stimulated or not with ghrelin 100 nM and harvested after 24 h of culture. After harvesting the cells, RT-PCR was performed to measure the mRNA expression of the GHS-R1a receptor. Values in the graphs represent means \pm SD resulting from 3 independent experiments.

Fig 5. Representation of the effect of ghrelin and GHS-R1a on differentiating osteoblasts.

Figures

Figure 1

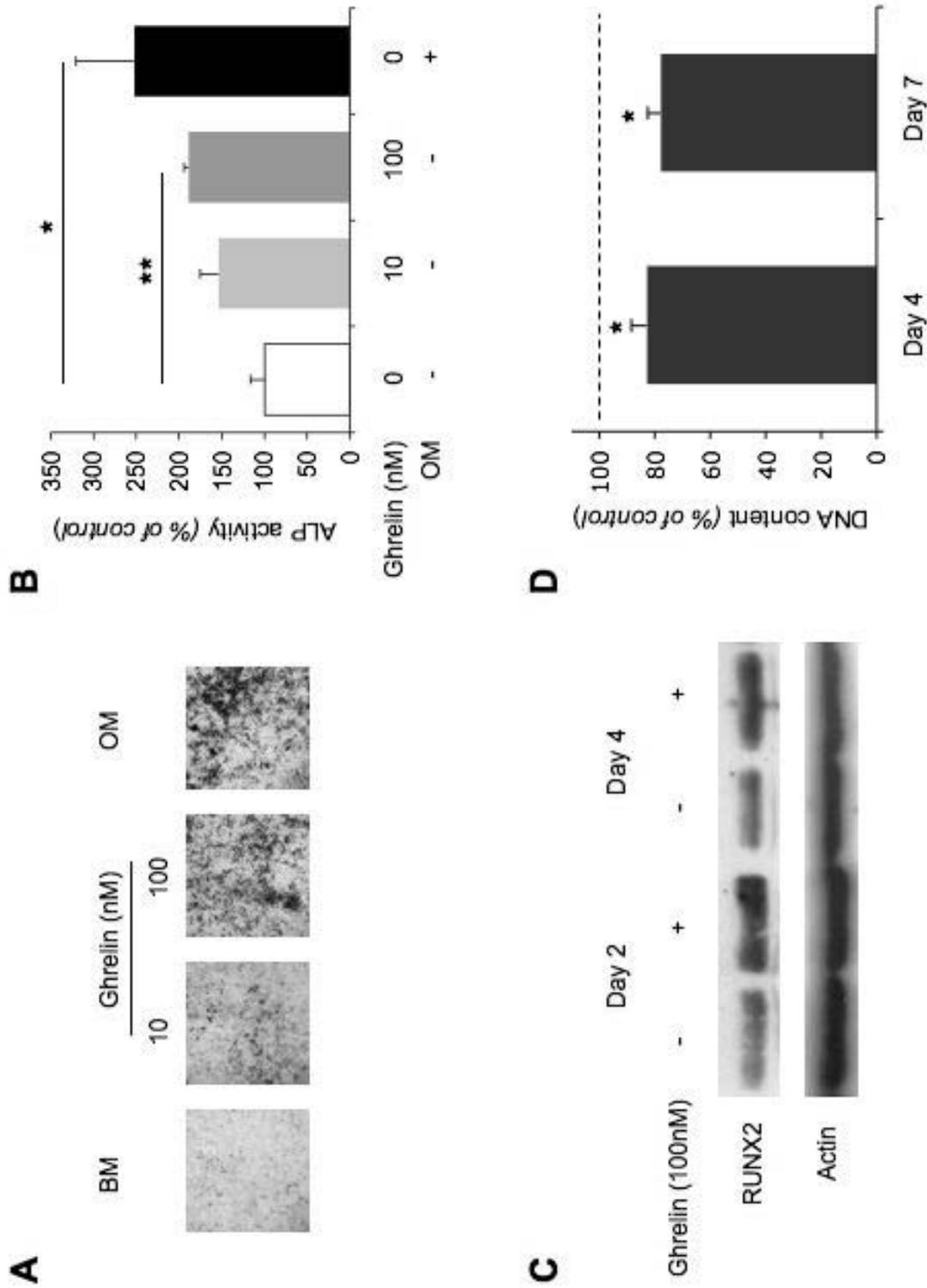


Figure 2

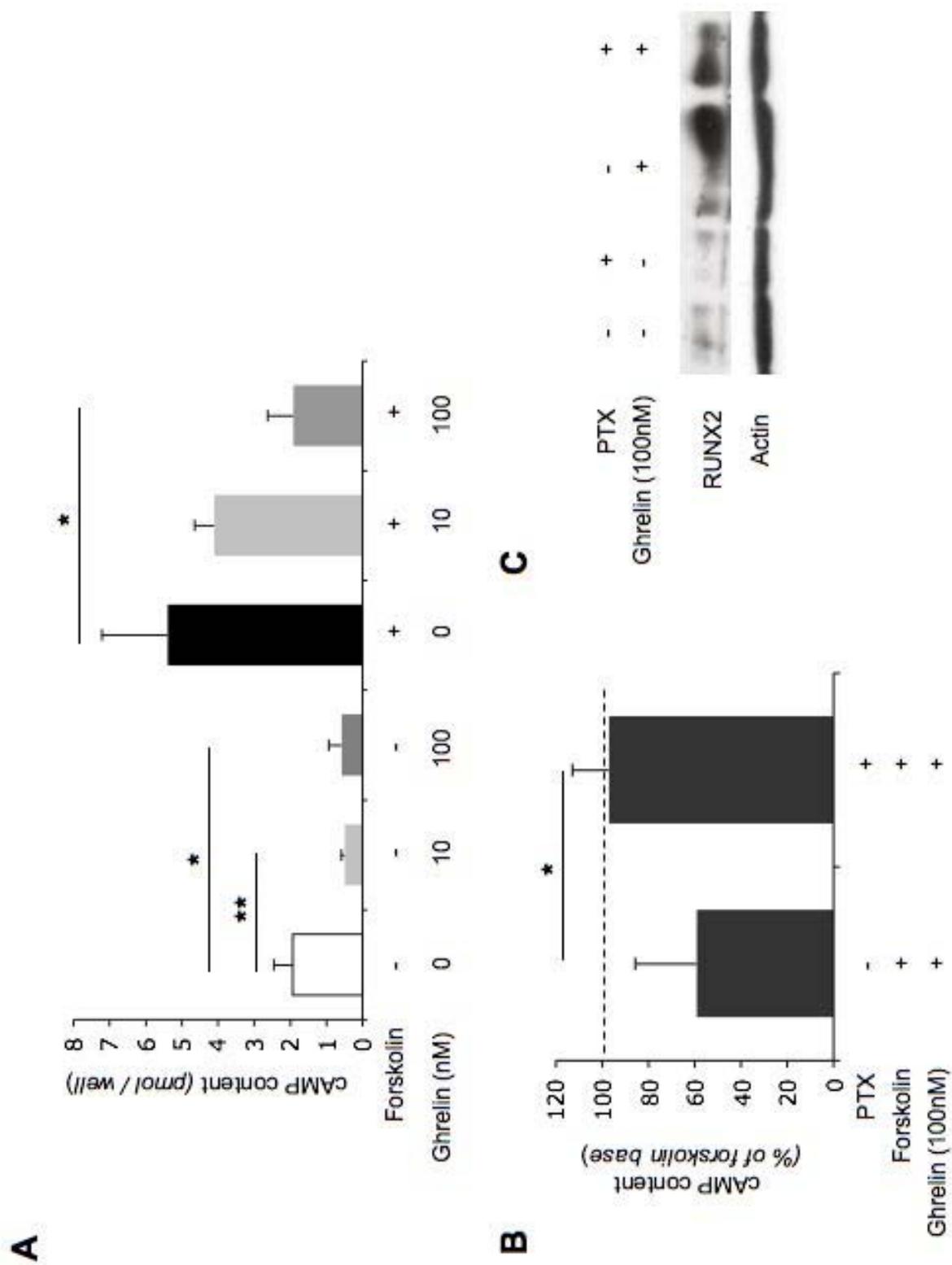


Figure 3

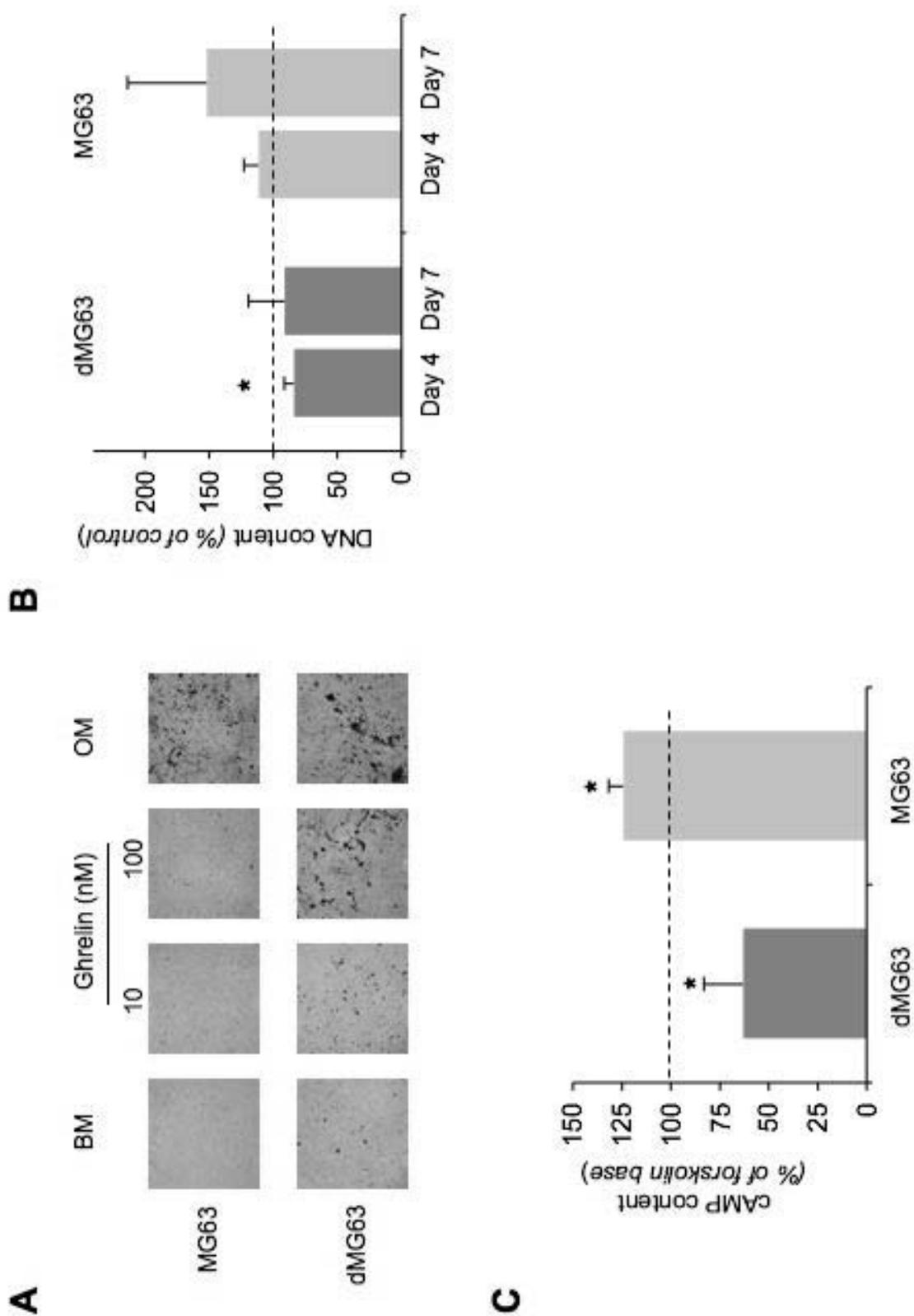


Figure 4

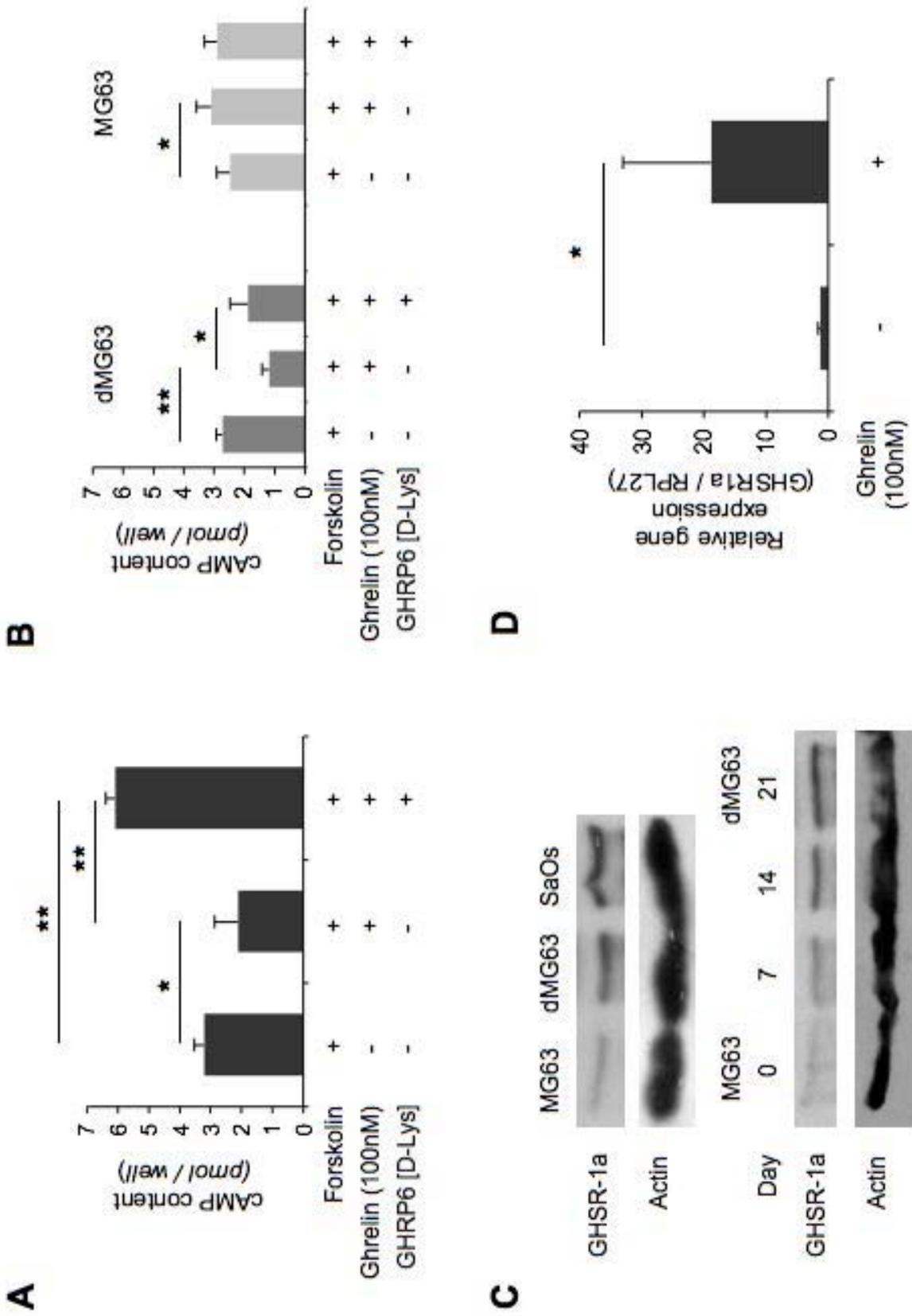
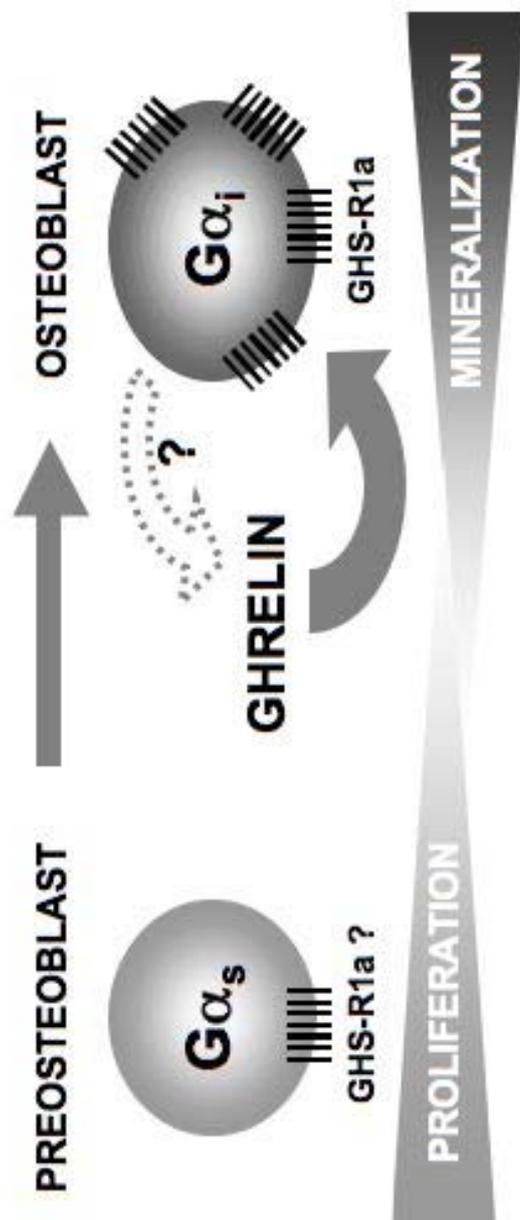


Figure 5



CONCLUSION

Nos résultats montrent que la voie Gi est nécessaire pour accomplir la différenciation ostéoblastique terminale chez l'Homme. Certes il est bien connu que la stimulation de l'adénylate cyclase, par la PTH par exemple, stimule l'ostéogénèse et particulièrement dans les phases précoces de différenciation. Mais une stimulation exclusive de Gs, comme dans le syndrome de MacCune Albright, conduit à la production d'un os dysplasique, fruit d'une différenciation ostéoblastique non aboutie. La voie de signalisation Gs n'est donc pas suffisante pour assurer la différenciation complète des ostéoblastes et pour obtenir un tissu osseux physiologique.

Notre étude préliminaire sur l'action *in vivo* du LPA n'a pas permis de conclure sur l'intérêt spécifique de ce facteur biologique pour le tissu osseux en raison d'un protocole expérimental imparfait. Mais des données bibliographiques récentes montrent son intérêt pour la différenciation ostéoblastique et corroborent les images d'ostéogénèse massive que nous avons obtenu (Mansell *et al.* 2012). En considérant ces résultats avec les résultats obtenus *in vitro* en ce qui concerne la Ghrelina, la voie Gi apparaît être nécessaire à la maturation ostéoblastique, indépendamment du ligand concerné. Cela rejoint les conclusions d'Hsiao *et al.* en 2010 qui suggéraient que dans le cas des récepteurs couplés aux protéines G, c'est l'activation globale de la voie de signalisation Gs ou Gi qui compte, plutôt que les propriétés spécifiques de tel ou tel ligand (Hsiao *et al.* 2010). D'ailleurs, nos résultats montrent que la Ghrelina a un effet intra-cellulaire opposé sur les cellules ostéoblastiques, en fonction de leur stade de différenciation. Un même ligand peut donc activer des voies opposées selon le moment où il intervient.

Physiologiquement, l'effet de la Ghrelina sur le tissu osseux dépendrait donc du moment où elle est exprimée, selon que le tissu osseux est composé de cellules immatures ou matures. Lors

du développement du squelette, le tissu osseux termine la phase de modelage des pièces osseuses à la puberté et entame alors la phase de remodelage des os qui persiste toute la vie. Il serait logique que le « switch » d'action de la Ghreline intervienne à ce moment là, passant d'un effet proliférateur sur les préostéoblastes, à un effet maturant sur les ostéoblastes différenciés et permettant ainsi le remodelage des pièces osseuses. D'ailleurs, Hsiao *et al* ont montré, à l'aide de récepteurs synthétiques, qu'il existe chez la souris une fenêtre temporelle de sensibilité à la voie Gs en début de vie post natale, au delà de laquelle elle devient néfaste pour la maturation osseuse (Hsiao *et al.* 2010).

D'autre part, l'équipe de Moreau, en étudiant des patients atteints de scoliose idiopathique de l'adolescent, a introduit l'idée de l'existence d'un rôle des oestrogènes dans le couplage du récepteur de la Mélatonine aux protéines Gi (Letellier *et al.* 2008). Ce couplage pourrait expliquer pourquoi cette scoliose se révèle principalement à l'adolescence et pourrait être à l'origine d'une modification de l'action du récepteur sur les protéines G. Nos résultats ne permettent pas d'expliquer le mécanisme exact du « switch » Gs / Gi que nous avons montré pour la Ghreline lors de la différenciation de l'ostéoblaste, mais l'effet du pic hormonal pubertaire sur le récepteur de la Ghreline, à l'image de ce qui a été montré pour la Mélatonine, serait une piste à explorer.

Dans le premier chapitre, nous avons résumé l'action centrale de la Ghreline en indiquant qu'elle s'assure que suffisamment d'énergie soit disponible pour que l'hormone de croissance puisse agir sur le développement de l'organisme et notamment celui du squelette. Nos résultats appuient également l'existence d'une action locale de la Ghreline sur le tissu osseux, et ce, à différents stades de différenciation de l'ostéoblaste. La Ghreline pourrait donc être un important chaînon du métabolisme osseux en agissant centralement pour assurer les besoins du métabolisme osseux et localement pour imprimer une orientation prioritaire aux cellules ostéoblastiques vers la prolifération ou la différenciation.

Notre travail fondamental est destiné à être appliqué à la physiopathologie humaine et notamment à la prise en charge de la scoliose idiopathique de l'adolescent (SIA). Cette maladie posturale liée au métabolisme osseux apparaît après la petite enfance, alors que la puberté se met en place. Chez les patients atteints (en majorité, des patientes) le taux de Ghreline augmente, alors que physiologiquement, le taux de Ghreline diminue avec l'âge. Ces constatations cliniques suggèrent une potentielle résistance cellulaire à la Ghreline, qui empêcherait son action de maturation au niveau du tissu osseux, particulièrement au niveau vertébral. Nous avons réalisé des expérimentations préliminaires sur des primocultures d'ostéoblastes issus de débris osseux obtenus lors de chirurgies des vertèbres de patientes atteintes. Les premiers résultats vont dans le sens d'une résistance à la Ghreline, mais restent assez hétérogènes. Il faudra des échantillons issus d'un grand nombre de patientes pour obtenir des résultats clairs et évoquer des stratégies thérapeutiques pour cette pathologie impliquant la Ghreline.

BIBLIOGRAPHIE

- Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur spine J.* 2001, 10 : 96-101.
- Ariyasu H, Takaya K, Iwakura H, Hosoda H, Akamizu T, Arai Y, Kangawa K, Nakao K. Transgenic mice overexpressing des-acyl ghrelin show small phenotype. *Endocrinology* 2005. 146 : 355-64.
- Aydin S, Ozercan IH, Geckil H, Dagli F, Aydin S, Kumru S, Kilic N, Sahin I, Ozercan MR. Ghrelin is present in teeth. *J Biochem Mol Biol.* 40 : 368-372.
- Azeddine B, Letellier K, Wang DS, Moldovan F, Moreau A. Molecular determinants of melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis. *Clin Orthop Relat Res.* 2007. 462 : 45-52.
- Becker W & Becker BE. Periodontal regeneration : a contemporary re evaluation. *Periodontology* 2000. 1999, 19 : 104 –114.
- Belloni AS, Macchi C, Rebuffat P, Conconi MT, Malendowicz LK, Parnigotto PP, Nussdorfer GG. Effect of ghrelin on the apoptotic deletion rate of different types of cells cultured in vitro. *Int J Mol Med.* 2004. 14 : 165-67.
- Blackburn J, Mansell JP. The emerging role of lysophosphatidic acid (LPA) in skeletal biology. *Bone* 2012. 50 : 756-762.
- Blair HC, Zaidi M, Schlesinger PH. Mechanisms balancing skeletal matrix synthesis and degradation. *Biochem J.* 2002. 364 : 329-41.
- Brunel G, Piantoni P, Elharar F, Benqué E, Marin P, Zahedi S. Regeneration of rat calvarial defects using a bioabsorbable membrane technique : influence of collagen cross-linking. *J Periodontol.* 1996, 67: 1342-1348.
- Camina JP. Cell biology of the ghreline receptor. *J Neuroendocrin.* 2006. 18 : 65-76.
- Caminos JE, Gualillo O, Lago F, Otero M, Blanco M, Gallego R, Garcia-Caballero T, Goldring MB, Casanueva FF, Gomez-Reino JJ, Dieguez C. The endogenous growth hormone secretagogue (ghrelin) is synthesized and secreted by chondrocytes. *Endocrinology.* 2005. 146 : 1285-92.
- Cardinali DP, Ladizesky MG, Boggio V, Cutrera RA, Mautalen C. Melatonin effects on bone: experimental facts and clinical perspectives. *J Pineal Res.* 2003. 34 : 81-7.
- Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008. 3 : 131-9.

- Cummings DE, Clement K, Purnell JQ, Vaisse C, Foster KE, Frayo RS, Schwartz MW, Basdevant A, Weigle DS. Elevated plasma ghrelin levels in Prader Willi syndrome. *Nat Med.* 2002. 8 : 643-4.
- Daluiski A, Engstrand T, Bahamonde ME, Gamer LW, Agius E, Stevenson SL, Cox K, Rosen V, Lyons KM. Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density. 2001. *Nat. Genet.* 27 : 84-88.
- Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology.* 2000. 141 : 4255-61.
- David M, Wannecq E, Descotes F, Jansen S, Deux B, Ribeiro J, Serre CM, Grès S, Bendriss-Vermare N, Bollen M, Saez S, Aoki J, Saulnier-Blache JS, Clézardin P, Peyruchaud O. Cancer Cell Expression of Autotaxin Controls Bone Metastasis Formation in Mouse through Lysophosphatidic Acid-Dependent Activation of Osteoclasts. *PLoS ONE* 2010. 5 : e9741.
- Delhanty PJD, van der Eerden BCJ, van der Velde M, Gauna C, Pols HAP, Jahr H, Chiba H, van der Lely AJ, van Leeuwen JPTM. Ghrelin and unacylated ghrelin stimulate human osteoblast growth via mitogen-activated protein kinase (MAPK)/phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathways in the absence of GHS-R1a. *J Endocrinol.* 2006. 188: 37-47.
- Deng F, Ling J, Ma J, Liu C, Zhang W. Stimulation of intramembranous bone repair in rats by ghrelin. *Exp Physiol.* 2008. 93 : 872-79.
- De Vriese C, Perret J, Delporte C. Focus on the short- and long-term effects of ghrelin on energy homeostasis. *Nutrition.* 2010. 6 : 579-84.
- Diss A, Hitzig C, Charbit Y, Salsou B. Le point sur les facteurs de croissance dans la régénération osseuse : revue de littérature. *JPIO* 2003. 22 : 5-19.
- Dornonville de la Cour C, Lindqvist A, Egecioglu E, Tung YCL, Surve V, Ohlsson C, Jansson JO, Erlanson-Albertsson C, Dickson SL, Hakanson R. Ghrelin treatment reverses the reduction in weight gain and body fat in gastrectomized mice. *Gut.* 2005. 54 : 907-13.
- Drouet C, Barré R, Brunel G, Dechambre G, Benqué E, Combes C, Rey C. Impact of calcium phosphate particle morphology on osteoinduction: an *in vivo* study. *Key Eng. Mater.* 2008. 361 : 1237-1240.

- Dziak R, Yang BM, Leung BW, Li S, Marzec N, Margarone J, Bobek L. Effects of sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid on human osteoblastic cells. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*. 2003, 68 : 239-249.
- Feigerlova E, Diene G, Conte-Auriol F, Molinas C, Gennero I, Salles JP, Arnaud C, Tauber M. Hyperghrelinemia precedes obesity in Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008. 93 : 2800-5.
- Fukumoto S, Martin TJ. Bone as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab*. 2009. 20 : 230-6.
- Fukushima N, Hanada R, Teranishi H, Fukue Y, Tachibana T, Ishikawa H, Takeda S, Takeuchi Y, Fukumoto S, Kangawa K, Nagata K, Kojima M. Ghrelin directly regulates bone formation. *J Bone Miner Res*. 2005. 20 : 790-8.
- Gaits F, Fourcade O, Le Balle F, Gueguen G, Gaigé B, Gassama-Diagne A, Fauvel J, Salles JP, Mauco G, Simon MF, Chap H. Lysophosphatidic acid as a phospholipid mediator : pathways of synthesis. *FEBS Lett*. 1997. 410 : 54-8.
- Gauna C, Delhanty, PJ, Hofland LJ, Janssen JA, Broglio F, Ross RJ, Ghigo E, van der Lely AJ. Ghrelin stimulates, whereas des-octanoyl ghrelin inhibits, glucose output by primary hepatocytes. *J Clin. Endocrinol. Metab*. 2005. 90 : 1055-1060.
- Gennero I, Laurencin-Dalcieux S, Conte-Auriol F, Briand-Mésange F, Laurencin D, Rue J, Beton N, Malet N, Mus M, Tokumura A, Bourin P, Vico L, Brunel G, Oreffo RO, Chun J, Salles JP. Absence of the lysophosphatidic acid receptor LPA1 results in abnormal bone development and decreased bone mass. *Bone*. 2011 Sep; 49(3) : 395-403.
- Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, Korbonits M. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002. 87 : 2988.
- Gomez R, Lago F, Gomez-Reino JJ, Dieguez C, Gualillo O. Expression and modulation of ghrelin O-acyltransferase in cultured chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2009. 60 : 1704-9.
- Haylock DN, Nilsson SK. Osteopontin: a bridge between bone and blood. *Br J Haematol*. 2006. 134 : 467-74.
- Hermans E. Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharm. Ther*. 2003. 99 : 25-44.

- Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberators PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong SS, Chaung LY, Elbrecht A, Dashkevich M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJS, Dean DC, Melillo DG, Patchett AA, Nargund R, Griffin PR, DeMartino JA, Gupta SK, Schaeffer JM, Smith RG, Van der Ploeg LHT. A Receptor in Pituitary and Hypothalamus That Functions in Growth Hormone Release. *Science* 1996. 273 : 974 - 977.
- Hsiao EC, Boudignon BM, Chang WC, Bencsik M, Peng J, Nguyen TD, Manalac C, Halloran BP, Conklin BR, Nissenson RA. Osteoblast expression of an engineered Gs-coupled receptor dramatically increases bone mass. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008. 105 : 1209-1214.
- Hsiao EC, Boudignon BM, Halloran BP, Nissenson RA, Conklin BR. Gs G protein-coupled receptor signaling in osteoblasts elicits age-dependent effects on bone formation. *JBMR*. 2010. 25 : 584-593.
- Huda MS, Durham BH, Wong SP, Dovey TM, McCulloch P, Kerrigan D, Pinkney JH, Fraser WD, Wilding JPH. Lack of an acute effect of ghrelin on markers of bone turnover in healthy controls and post-gastrectomy subjects. *Bone*. 2007. 41 : 406-13.
- Ishii S, Noguchi K, Yanagida K. Non Edg family lysophosphatidic acid (LPA) receptors. *Prostag Oth Lip M*. 2009. 89 : 57-65.
- Karsenty G. Transcriptional control of skeletogenesis. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet*. 2008. 9 : 183-96.
- Kartsogiannis V, Ng KW. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. *Mol. Cell. Endocrinol*. 2004. 228 : 79-102.
- Kémoun P, Laurencin-Dalicioux S, Rue J, Farges JC, Gennero I, Conte-Auriol F, Briand-Mesange F, Gadelorge M, Arzate H, Narayanan AS, Brunel G, Salles JP. Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. *Cell Tissue Res*. 2007 : 283-94.
- Kémoun P, Laurencin-Dalicioux S, Rue J, Vaysse F, Roméas A, Arzate H, Conte-Auriol F, Farges JC, Salles JP, Brunel G. Localization of STRO-1, BMP-2/-3/-7, BMP receptors and phosphorylated Smad-1 during the formation of mouse periodontium. *Tissue Cell*. 2007 : 257-66.

- Kim SW, Her SJ, Park SJ, Kim D, Park KS, Lee HK, Han BH, Kim MS, Shin CS, Kim SY. Ghrelin stimulates proliferation and differentiation and inhibits apoptosis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Bone*. 2005. 37 : 359-69.
- Kim SW, Choi OK, Jung JY, Yang JY, Cho SW, Shin CS, Park KS, Kim SY. Ghrelin inhibits early osteogenic differentiation of C3H10T1/2 cells by suppressing Runx2 expression and enhancing PPAR γ and C/EBP α expression. *J Cell Biochem*. 2009. 106 : 626-32.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999. 402 : 656-60.
- Kojima M, Kangawa K. Ghrelin : structure an function. *Physiol. Rev*. 2005. 85 : 495-522.
- Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by Runx2. *Cell Tissue Res*. 2010. 339 : 189-95.
- Korbonits M, Bustin SA, Kojima M, Jordan S, Adams EF, Lowe DG, Kangawa K, Grossman AB. The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2001. 86 : 881-887.
- Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature*. 2003. 423 : 332-6.
- Lehto-Axtelius D, Chen D, Surve VV, Hakanson R. Post-gastrectomy osteopenia in the rat: bone structure is preserved by retaining 10%-30% of the oxyntic gland area. *Scand J Gastroenterol*. 2002. 37 : 437-43.
- Letellier K, Azeddine B, Parent S, Labelle H, Rompre PH, Moreau A, Moldovan F. Estrogen cross-talk with the melatonin signaling pathway in human osteoblasts derived from adolescent idiopathic scoliosis patients. *J. Pineal Res*. 2008. 45 : 383-393.
- Li Z, Zhou X, Dai Z, Zou X. Classification of G-protein coupled receptors based on support vector machine with maximum relevance minimum redundancy and genetic algorithm. *BMC Bioinformatics*. 2010. 11 (1) : 325.
- Liu YB, Kharode Y, Bodine PV, Yaworsky PJ, Robinson JA, Billiard J. LPA induces osteoblast differentiation through interplay of two receptors: LPA1 and LPA4. *J Cell Biochem*. 2010. 109 : 794-800.
- Maccarinelli G, Sibilila V, Torsello A, Raimondo F, Pitto M, Giustina A, Netti C, Cocchi D. Ghrelin regulates proliferation and differentiation of osteoblastic cells. *J Endocrinol*. 2005. 184 : 249-56.
- Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol*. 2004. 25 : 177-95.

- Mansell JP, Brown J, Knapp JG, Faul C, Blom AW. Lysophosphatidic acid-functionalised titanium as a superior surface for supporting human osteoblast (MG63) maturation. *European Cells and Materials* 2012. 23 : 348-36.
- Marie P. Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste. *m/s* 2001. 17 : 1252-9.
- Misra M, Miller KK, Stewart V, Hunter E, Kuo K, Herzog DB, Klibanski A. Ghrelin and bone metabolism in adolescent girls with anorexia nervosa and healthy adolescents. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005. 90 : 5082-7.
- Moreau A, Wang DS, Forget S, Azeddine B, Angeloni D, Frascini F, Labelle H, Poitras B, Rivard CH, Grimard G. Melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 2004. 29 : 1772-81.
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell.* 2002. 108 : 17-29.
- Nikolopoulos D, Theocharis S, Kouraklis G. Ghrelin, another factor affecting bone metabolism. *Med. Sci. Monit.* 2010. 16 : 147-162.
- Noguchi K, Herr D, Mutoh T, Chun J. Lysophosphatidic acid (LPA) and its receptors. *Curr Opin Pharmacol.* 2009. 9 : 15-23.
- Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch.* 2010. 77 : 4-12.
- Pacheco-Pantoja EL, Ranganath LR, Gallagher JA, Wilson P, Fraser WD. Receptors and effects of gut hormones in three osteoblastic cell lines. *BMC Physiology.* 2011 11:12.
- Panupinthu N, Rogers JT, Zhao L, Solano-Flores LP, Possmayer F, Sims SM, Dixon SJ. P2X7 receptors on osteoblasts couple to production of lysophosphatidic acid: a signaling axis promoting osteogenesis. *J Cell Biol.* 2008. 181 : 859-71.
- Papaioannou S, Tumber AM, Meikle MC, McDonald F. G-protein signalling pathways and oestrogen: a role of balanced maintenance in osteoblasts. *Biochim Biophys Acta - (Molecular Cell Research).* 1999. 1449 : 284-92.
- Pemberton CJ, Richards AM. Biochemistry of ghrelin precursor peptides. *Vitam Horm.* 2008. 77 : 13-30.

- Peng J, Bencsik M, Louie A, Lu W, Millard S, Nguyen P, Burghardt, Majumbar S, Wronski TJ, Halloran B, Conklin BR, Nisseson RA. Conditional expression of a Gi-coupled receptor in osteoblasts results in trabecular osteopenia. *Endocrinology*. 2008. 149 : 1329-1337.
- Pereira BP, Zhou Y, Gupta A, Leong DT, Aung KZ, Ling L, Pho RW, Galindo M, Salto-Tellez M, Stein GS, Cool SM, van Wijnen AJ, Nathan SS. Runx2, p53, and pRB status as diagnostic parameters for deregulation of osteoblast growth and differentiation in a new pre-chemotherapeutic osteosarcoma cell line (OS1). *J Cell Physiol*. 2009. 221 : 778-88.
- Petersen PS, Woldbye D, Madsen AN, Egerod KL, Jin C, Lang M, Rasmussen M, Beck-Sickinger AG, Holst B. *In vivo* characterization of high basal signaling from the ghrelin receptor. *Endocrinology*. 2009. 150 : 4920 - 30.
- Premont RT, Gainetdinov RR. Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annu Rev Physiol*. 2007. 69 : 511-34.
- Saba JD. Lysophospholipids in development : miles apart and edging in. *J Cell Biochem*. 2004, 92 : 967-992 (2004).
- Saulnier-Blache J., [Lysophosphatidic acid: a "bioactive" phospholipid]. *Med Sci (Paris)*. 2004. 20 : 799-803.
- Schellekens H, Dinan TG, Cryan JF. Lean mean fat reducing "ghrelin" machine: hypothalamic ghrelin and ghrelin receptors as therapeutic targets in obesity. *Neuropharmacology*. 2010. 58 : 2-16.
- Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*. 1986, 205 : 299-308.
- Seim I, Collet C, Herington AC, Chopin LK. Revised genomic structure of the human ghrelin gene and identification of novel exons, alternative splice variants and natural antisense transcripts. *BMC Genomics*. 2007. 8 : 298.
- Shapira L, Halabi A. Behavior of two osteoblast-like cell lines cultured on machined or rough titanium surfaces. *Clin. Oral Impl. Res*. 2009. 20 : 50-55.
- Shuto Y, Shibasaki T, Otagiri A, Kuriyama H, Ohata H, Tamura H, Kamegai J, Sugihara H, Oikawa S, Wakabayashi I. Hypothalamic growth hormone secretagogue receptor regulates growth hormone secretion, feeding, and adiposity. *J Clin Invest*. 2002.109 : 1429-1436.

- Sibilila V, Cocchi D, Pagani F, Lattuada N, Moro GL, Pecile A, Rubinacci A, Muller EE, Netti C. Hexarelin, a growth hormone-releasing peptide, counteracts bone loss in gonadectomized male rats. *Growth Horm IGF Res.* 1999. 9 : 219-27.
- Soares JB, Leite-Moreira AF. Ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin: three pieces of the same puzzle. *Peptides.* 2008. 29 : 1255–1270.
- Sturm A, Sudermann T, Schulte KM, Goebell H, Dignass AU. Modulation of intestinal epithelial wound healing in vitro and in vivo by lysophosphatidic acid. *Gastroenterology.* 1999, 117 : 368-377.
- Sun Y, Ahmed S, Smith RG. Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. *Mol Cell Biol* 2003. 23 : 7973-7981.
- Sun Y, Wang P, Zheng H, Smith RG. Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004. 101 : 4679 – 4684.
- Tang N, Song WX, Luo J, Haydon RC, He TC. Osteosarcoma development and stem cell differentiation. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2008. 466 : 2114-2130.
- Tauber M, Conte Auriol F, Moulin P, Molinas C, Delagnes V, Salles JP. Hyperghrelinemia is a common feature of Prader-Willi syndrome and pituitary stalk interruption: a pathophysiological hypothesis. *Horm Res.* 2004. 62 : 49-54.
- Teplyuk NM, Galindo M, Teplyuk VI, Pratap J, Young DW, Lapointe D, Javed A, Stein JL, Lian JB, Stein GS, van Wijnen AJ. Runx2 regulates G protein-coupled signaling pathways to control growth of osteoblast progenitors. *J Biol Chem.* 2008. 283 : 27585-97.
- Tintut Y, Parhami F, Le V, Karsenty G, Demer LL. Inhibition of osteoblast-specific transcription factor Cbfa1 by the cAMP pathway in osteoblastic cells: Ubiquitin/proteasome-dependent regulation. *J Biol Chem.* 1999. 274 : 28875-9.
- Tritos NA, Kokkotou EG. The physiology and potential clinical applications of ghrelin, a novel peptide hormone. *Mayo Clin Proc.* 2006. 81 : 653-60.
- Ueberberg B, Unger N, Saeger W, Mann K, Petersenn S. Expression of ghrelin and its receptor in human tissues. *Horm Metab Res.* 2009. 41 : 814-21.
- Veldhuis JD, Bowers CY. Integrating GHS into the Ghrelin System. *Int J Pept.* 2010. 1-40.
- Wang DH, Hu YS, Du JJ, HuY Y, Zhong WD, Qin WJ. Ghrelin stimulates proliferation of human osteoblastic TE85 cells via NO/cGMP signaling pathway. *Endocrine.* 2009. 35 : 112-17.

- Wiesmann HP, Joos U, Meyer U. Biological and biophysical principles in extracorporeal bone tissue engineering. Part II. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2004, 33 : 523-530.
- Wikesjö UM & Selvig KA. Periodontal wound healing and regeneration. *Periodontology* 2000. 1999, 19 : 21-39.
- Wortley KE, Anderson K, Garcia K, Murray J, Malinova L, Liu R, Moncrieffe M, Thabet K, Cox H, Yancopoulos GD, Wiegand SJ, Sleeman MW. Deletion of ghrelin reveals no effect on food intake, but a primary role in energy balance. *Obesity Res.* 2004. 12 : 170.
- Wortley KE, Anderson KD, Garcia K, Murray JD, Malinova L, Liu R, Moncrieffe M, Thabet K, Cox HJ, Yancopoulos GD, Wiegand SJ, Sleeman MW. Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004. 101 : 8227-8232.
- Yadav VK, Oury F, Suda N, Liu ZW, Gao XB, Confavreux C, Klemenhagen KC, Tanaka KF, Gingrich JA, Guo XE, Tecott LH, Mann JJ, Hen R, Horvath TL, Karsenty G. A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure. *Cell* 2009. 138 : 976-89.
- Yadav VK, Ryu JH, Suda N, Tanaka KF, Gingrich JA, Schütz G, Glorieux FH, Chiang CY, Zajac JD, Insogna KL, Mann JJ, Hen R, Ducky P, Karsenty G. Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. *Cell* 2008. 135 : 825-37.
- Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* 2008. 132 : 387-96.
- Zhang J, Tu Q, Chen J. Applications of transgenics in studies of bone sialoprotein. *J Cell Physiol.* 2009. 220 : 30-4.
- Zhang JV, Ren PG, Avsian-Kretchmer O, Luo CW, Rauch R, Klein C, Hsueh AJW. Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 2005. 310 : 996-999.
- Zittel TT, Zeeb B, Maier GW, Kaiser GW, Zwirner M, Liebich H, Starlinger M, Becker HD. High prevalence of bone disorders after gastrectomy. *Am J Surg.* 1997. 174 : 431-8.

ANNEXES

Impact of Calcium Phosphate Particle Morphology on Osteoconduction: an *in vivo* study

Christophe Drouet^{1,a}, Ronan Barré^{2,b}, Gérard Brunel^{2,c}, Gérard Dechambre^{1,d},
Edmond Benqué, Christèle Combes^{1,e}, Christian Rey^{1,f}

¹CIRIMAT-Institut Carnot UMR CNRS 5085, ENSIACET, 118 route de Narbonne, 31077 Toulouse
Cedex 4, France

²Laboratoire de Microbiologie parodontale et régénération du parodonte, Université Paul Sabatier,
3 chemin des Maraichers, 31062 Toulouse Cedex, France

^achristophe.drouet@ensiacet.fr, ^bronan.barre@hotmail.fr, ^cbrunel@cict.fr,
^dgerard.dechambre@ensiacet.fr, ^echristele.combes@ensiacet.fr, ^fchristian.rey@ensiacet.fr

Keywords: osteoconduction, calcium phosphate, particle morphology

Abstract. Apatite/ β -TCP particles exhibiting non-conventional *urchin-like morphology* were prepared by hydrothermal synthesis. Their implantation in the rat calvarium was followed during 60 days. A total absence of osteoconduction was observed despite a favorable chemical composition, stressing the fundamental role of *particle morphology* on bone regeneration. Results are discussed in relation with other literature data. Possible explanations include the disfavored accumulation of biological mediators due to the acicular shape of the particles and/or a limited accessibility for cells.

Introduction

Calcium phosphates (CaP) are major constituents of hard tissues. As such, CaP ceramics are widely used for bone regeneration applications [1,2], either as compacts, granules or 3D porous scaffolds. In particular, mixtures of hydroxyapatite (HA) and β -tricalcium phosphate (β -TCP) are extensively used today for the preparation of such scaffolds, where the presence of β -TCP permits to artificially increase the overall resorption rate of the scaffold after implantation thanks to its higher solubility [3].

Due to their chemical composition involving calcium and phosphate ions, such CaP compounds are often considered as good osteoconductive materials. However, in addition to the chemical composition, several reports have stressed the impact on osteoconduction or osteoinduction of other physico-chemical parameters such as surface topology or particle size on bone repair [4,5]. Some authors have underlined the potential role of such parameters on various biological performances of CaP-based biomaterials (extent of bone formation [5], inflammatory response [6]), indicating that the tridimensional structure of biomaterials was a key factor in bone regeneration processes. The presence of micropores on the walls of macroporous scaffolds was also shown to play a major role in activating bone formation [7,8,9] and similar conclusions were also reached for other systems (e.g. titanium [10]).

Although the exact function of these physico-chemical parameters on bone repair has not been unambiguously unveiled, some tentative explanations have been proposed in the literature. In particular, the effect of microporosity was linked to the increased capability to adsorb proteins and store growth factors such as BMP (bone morphogenetic protein), making it possible to reach the threshold needed for bone formation activation [7-10]. Also, a greater specific surface area is thought to boost ion exchange processes with body fluids, leading to the enhanced formation of a bone-like apatite layer on the surface of the implanted biomaterial [8]. Other explanations are based on cell behavior [9], as cells are thought to develop better in a confined system (e.g. inner pores).

Despite the wide use of such CaP compounds for bone regeneration, and in particular of HA/ β -TCP biphasic bioceramics, the roles of particle morphology and surface state on biological performances remain unclear. In order to shed some more light on these aspects, we provide and discuss in this contribution some original results obtained *in vivo* after implantation, in the rat calvarium, of non-conventional *urchin-like particles* composed of apatite/ β -TCP.

Materials and Methods

Materials synthesis. *Urchin-like* biphasic apatite/ β -TCP particles were prepared in situ by partial hydrolysis of β -TCP (free of magnesium impurity) in the presence of water vapor, through hydrothermal treatment at 160 °C for 24 h using the custom-built setup shown in Figure 1. The samples were then sieved in order to retain only the particle size fraction in the range 100-180 μ m, and sterilized by gamma rays (32 kGy).

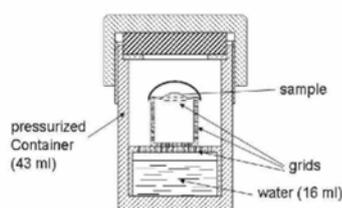


Figure 1: Custom-built setup for hydrothermal preparation of urchin-like HA/ β -TCP particles

Surgical procedure and histology. *In vivo* experiments were performed on eight Wistar male rats aged 4-5 months (350-400 g). The rats were randomly split into two subgroups: experimental and control. Anesthesia was performed through injection of ketamine sulfate (1 ml/100 g body weight). A midparietal transosseous calvarial defect (6-mm diameter) was created. In the experimental subgroup, the lesion was filled with the apatite/ β -TCP material. In the control subgroup, no material was placed in the bone defect. In all cases, the periosteum and skin were repositioned and sutured. The osteoconduction ability was evaluated through histological analyses carried out 10, 20, 30 and 60 days after surgical operation, on both subgroups.

Results

The partial hydrolysis of pure β -TCP carried out by hydrothermal synthesis led to biphasic apatite/ β -TCP particles as shown by XRD (Fig. 2a). FTIR analyses confirmed this conclusion and showed that the apatite phase was highly hydroxylated as shown by the presence of intense bands at 3565 and 632 cm^{-1} in proportions close to those of HA. Comparison of the XRD pattern with that of known mechanical mixtures of HA and β -TCP indicated that the sample composition approached 30% apatite / 70% β -TCP (weight %). A closer investigation of the apatite phase was made possible by subtracting, from the overall XRD pattern, the contribution of the β -TCP phase (Fig. 2b). For this subtraction, the XRD pattern of the initial β -TCP was used so as to keep similar microstrain and size effects on peak broadening. Despite baseline artifacts around major β -TCP peak positions, the apatite phase can clearly be identified by its main diffraction lines. This phase exhibits a high degree of crystallinity as indicated by the sharp definition of the peaks, and lattice parameters were evaluated to $a = 9.41 \pm 0.02 \text{ \AA}$ and $c = 6.87 \pm 0.03 \text{ \AA}$, which are close from the values ($a = 9.418 \text{ \AA}$, $c = 6.884 \text{ \AA}$) reported for stoichiometric HA (JCPDS 09-432). SEM analyses performed on such apatite/ β -TCP particles indicate an unusual *urchin-like morphology* (Fig. 3a) with a core composed of non-hydrolyzed β -TCP and packed surface apatite needles (average length 20-30 μ m). The apparent density of the sample, without compaction, was found to be 0.35 g/cm^3 .

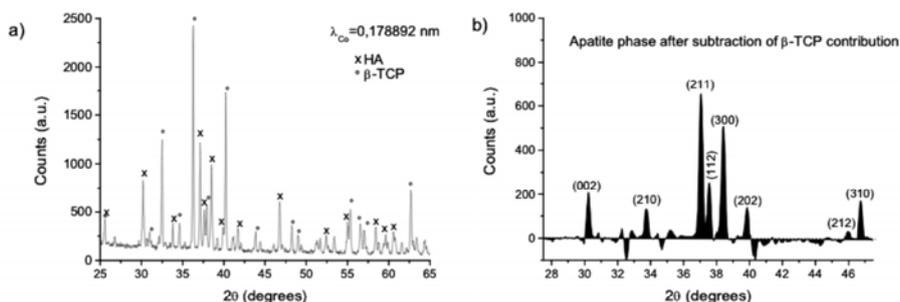


Figure 2: a) XRD pattern of urchin-like HA/ β -TCP particles
b) XRD pattern of apatite phase after subtracting β -TCP contribution

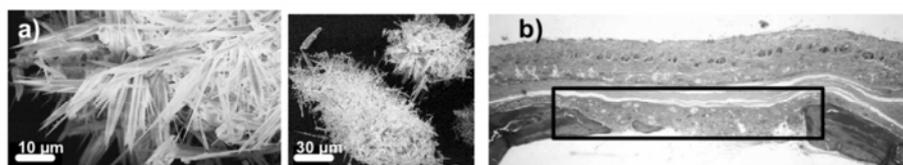


Figure 3: a) Urchin-like HA/ β -TCP particles (SEM), b) histological observation at day 60

Histological analysis performed after implantation of these urchin-like apatite/ β -TCP particles showed the absence of inflammatory wells. The implant was well tolerated *in vivo* during the whole duration of the experiment. The implantation sites showed in all cases the physical filling of the bone defect by the material, preventing surrounding soft tissues to fall off in the lesion. However, no signs of bone regeneration could be noticed throughout the experiment (Fig. 3b), although the material was still clearly visible in the lesion. Histological observations indicate that the defect is progressively occupied by a poorly-vascularized conjunctive fibrous tissue. In the control subgroup, no bone formation was observed, and soft tissues have progressively invaded the defect leaving a thin layer of conjunctive fibrous tissue.

Discussion

Although no adverse effects were evidenced after implantation, a total absence of bone regeneration was interestingly observed during the 60-day period. Histological analyses revealed that the particles remained observable throughout the study. This can be linked to the physico-chemical characteristics of the apatite phase (high crystallinity, high hydroxylation, lattice parameters close from HA) indicating that this phase is closer from stoichiometry than nanocrystalline biological apatites or immature synthetic analogues [11,12], which implies a greater chemical stability. The absence of bone repair therefore cannot be explained by an early resorption.

Literature data generally report the high bone formation ability of sintered HA/ β -TCP mixtures (e.g. 3D porous scaffolds) [1,2], with an even higher crystallinity. However, in this work, the biphasic particles exhibited a non-conventional morphology (urchins), and the absence of osteoconduction stresses thus the impact of 3D architecture on bone regeneration. This matter was already pointed out by several authors in the case of various materials [4-10], where the strong influence of surface roughness and pore size, in particular, were unveiled.

These apatite/ β -TCP particles show a prominent *convex morphology*, with needles spreading outward. As such, they could be regarded in some way as the “negative” or “complementary” morphology of 3D porous scaffolds (Fig. 4), often used in bone repair, which exhibit a pronounced concavity accessible to cells. The micropores in the latter could be seen as micro-reservoirs for

biological mediators such as growth factors, for which adequate concentration thresholds able to trigger bone formation could be reached, enabling proper cell stimulations. Such thresholds (e.g. for BMP) and their implication in bone regeneration were commented in some works [7-10]. Similarly, CaP dissolution-precipitation processes could be favored in micropores where the concentration in released ions could remain locally elevated. In contrast, the convex urchin morphology is likely to disfavor such molecular or ionic accumulations, at least in areas easily reachable for cells. The limited cell accessibility linked to the presence of close-packed intermingled needles (20-30 μm in length) at the basis of the particles could also directly contribute to the absence of bone repair.

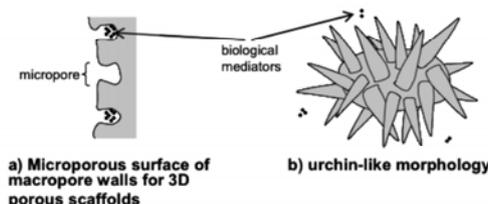


Figure 4 : Schematic morphology of a) 3D micro/macroporous scaffolds, and b) urchin-like particles

Conclusions

This work reports the absence of bone regeneration after implantation in the rat calvarium of apatite/ β -TCP *urchin-like particles*, despite the favorable chemical composition. This morphology might disfavor local accumulation of biological mediators, in contrast to microporous systems, and a limited cell accessibility probably also contributes to the absence of bone formation. This work also shows the need to control bioceramics surface topology during their whole processing, as such acicular morphologies might also be encountered after wet sterilization of hydrolysable β -TCP-containing phases, especially HA/ β -TCP ceramics, or after aqueous treatments of plasma-sprayed coatings carried out to improve their crystallinity.

References

- [1] R.Z. Legeros, J. Legeros: *Int. J. Oral-Med. Sci.* 4 (2006) 117-123.
- [2] G. Daculsi, O. Laboux, O. Malard, P. Weiss: *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 14 (2003) 195-200.
- [3] J.D. De Bruijn, Y.P. Bovell, C.A. Van Blitterswijk: *Bioceramics* 7 (1994) 293-298.
- [4] T.J. Webster, R.W. Siegel, R. Bizios: *Scripta Mater.* 44 (2001) 1639-1642.
- [5] M.H. Mankani, S.A. Kuznetsov, B. Fowler, A. Kingman, P.G. Robey: *Biotechnol. Bioeng.* 72 (2001) 96-107.
- [6] P. Laquerrière, A. Grandjean-Laquerrière, E. Jallot, G. Balossier, P. Frayssinet, M. Guenounou: *Biomaterials* 24 (2003) 2739-2747.
- [7] D. Le Nihouannen, G. Daculsi, A. Saffarzadeh, O. Gauthier, S. Delplace, P. Pilet, P. Layrolle: *Bone* 36 (2005) 1086-1093.
- [8] H. Yuan, K. Kurashina, J.D. De Bruijn, Y. Li, K. De Groot, X. Zhang: *Biomaterials* 20 (1999) 1799-1806.
- [9] P. Habibovic, H. Yuan, C.M. Van Der Valk, G. Meijer, C.A. Van Blitterswijk, K. De Groot: *Biomaterials* 26 (2005) 3565-3575.
- [10] S. Fujibayashi, M. Neo, H.M. Kim, T. Kokubo, T. Nakamura: *Biomaterials* 25 (2004) 443-450.
- [11] C. Rey, C. Combes, C. Drouet, H. Sfihi, A. Barroug: *Mat. Sci. Eng. C* 27 (2007) 198-205.
- [12] C. Rey, C. Combes, C. Drouet, H. Sfihi: *Adv. Sci. Technol.* 49 (2006) 27-36.

AUTEUR : Ronan BARRÉ

TITRE : ÉTUDE DU RÔLE DES RÉCEPTEURS COUPLÉS AUX PROTÉINES G LORS DE LA DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE DES OSTÉOBLASTES : INTÉRÊT DE LA VOIE Gi.

RESUME : Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) agissent via différentes voies de signalisation intracellulaires telles que Gs ou Gi, régulant la production d'AMPc par l'adénylcyclase. Nos travaux ont porté sur ces voies de signalisation lors de la différenciation cellulaire des ostéoblastes et plus particulièrement la voie Gi activée par le LPA (Acide LysoPhosphatidique) ou la Ghrelina. Nous avons d'abord étudié *in vivo* l'intérêt du LPA dans la cicatrisation de défauts osseux de taille critique pratiqués sur des rats. Les résultats de cette étude préliminaire sont hétérogènes et justifieraient une expérimentation plus poussée. Notre approche *in vitro* évalue l'effet de la Ghrelina sur la différenciation de lignées humaines, MG63 et SaOs, décrites précédemment comme des cellules respectivement préostéoblastiques et ostéoblastiques. Nos résultats montrent que sur les ostéoblastes matures, la Ghrelina active une voie Gi/AMPc dépendante de son récepteur GHS-R1a et que celle-ci permet la différenciation terminale des ostéoblastes. En conclusion, nos résultats indiquent que la voie Gi a une importance majeure pour la différenciation terminale des ostéoblastes.

MOTS CLES : Ostéoblastes, Différenciation, RCPG, Ghrelina

TITLE: STUDY OF THE ROLE OF G PROTEIN COUPLED RECEPTORS IN OSTEOBLASTS CELL DIFFERENTIATION: INTEREST OF THE Gi PATHWAY.

ABSTRACT : The G protein-coupled receptors (GPCRs) act via different intracellular signaling pathways such as Gs or Gi, which regulate cAMP production by adenylyclase. Our work has focused on the involvement of these signaling pathways during cell differentiation of osteoblasts and especially the Gi pathway activated by LPA (lysophosphatidic acid) or ghrelin. We first investigated *in vivo* the interest of the LPA in the healing of critical size bone defects performed on rats. The results of this preliminary study are heterogenous and warrant further experimentation. Our *in vitro* approach studies the effect of ghrelin on the differentiation of human cell lines, MG63 and Saos, previously described as preosteoblastic and osteoblastic cells, respectively. Our results show that of the mature osteoblasts, ghrelin activates a Gi/cAMP pathway dependent of its receptor GHS-R1a and the latter allows the terminal differentiation of osteoblasts. In conclusion, our results suggest that the Gi pathway is of major importance for the terminal differentiation of osteoblasts.

KEY WORDS: Osteoblast, Differentiation, GPCR, Ghrelin.