



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

THÈSE EN COTUTELLE

Présentée pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

ET DE L'UNIVERSITÉ LIBANAISE, *LIBAN*

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

Par

Dima GHANNOUM

**Rôle physiologique et physiopathologique de la xylosyltransférase I
dans le développement ostéoarticulaire**

Soutenance le 18 Décembre 2018

Membres du jury

Dr. Franck VERRECCHIA	DR INSERM	Université de Nantes	Rapporteur
Pr. Hang-Korng EA	Professeur	Université Paris 7	Rapporteur
Dr. Catherine BAUGÉ	MCU	Université de Caen Normandie	Examineur
Pr. Samir TAHA	Professeur	Université Libanaise	Co-directeur de thèse
Dr. Mohamed OUZZINE	DR INSERM	Université de Lorraine	Directeur de thèse

Membre invité

Dr. Chaza HARMOUCH	MCU	Université Libanaise	Co-encadrante Liban
---------------------------	-----	----------------------	----------------------------

UMR 7365 CNRS-UL en Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire. Faculté de Médecine,
VANDOEUVRE-LÈS-NANCY

Laboratoire de Biotechnologie Appliquée : Biomolécules, Biothérapies et Bioprocédés, Centre AZM pour la Recherche
en Biotechnologie et ses Applications, Ecole Doctorale des Sciences et Technologies, Université Libanaise, *LIBAN*

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier grandement mon directeur de thèse en France, **Monsieur Mohamed OUZZINE**, Directeur de recherche à l'INSERM, de m'avoir permis d'effectuer mes travaux de thèse au sein de son équipe « MolCeITEG », pour mon soutien continu, pour sa patience, sa motivation, ses connaissances immenses, sa disponibilité permanente et ses conseils qui m'ont aidé tout au long de la recherche et de la rédaction de cette thèse. Je lui témoigne mon respect et ma sincère reconnaissance.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse au Liban et mon responsable de master 2, **Monsieur Samir TAHA**, Professeur à l'Université Libanaise, d'avoir accepté d'encadrer mes travaux de thèse, et pour sa discussion performante. Je lui remercie infiniment.

J'adresse tous mes remerciements à **Monsieur Hang-Korng EA**, professeur à l'Université Paris 7, ainsi qu'à **Monsieur Franck VERRECCHIA**, Directeur de recherche à l'Université de Nantes, de l'honneur qu'ils m'ont fait d'avoir accepté de juger mes travaux de thèse.

Je remercie également **Madame Catherine BAUGÉ**, Maître de conférences à l'Université de Caen Normandie, pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse et l'intérêt qu'elle a pour témoigner mes travaux de thèse.

Lydia, je te remercie pour les commandes rapides que t'avais fait pour nos expériences. Je ne peux pas oublier ta façon formidable de manipuler et de finir à temps. Je souhaite devenir un jour comme toi. Je te remercie grandement pour toutes les corrections performantes et les commentaires qui ont rendu mon manuscrit plus correct.

Chaza, c'est vrai que nos discussions sont toujours par Whatsapp, mais je te remercie de tout mon cœur de m'avoir considéré comme une de tes amies et de m'avoir rassuré que tout va bien passer.

Je remercie l'**Université Libanaise** et l'association **AZM et SAADE** d'avoir financé mes travaux durant ces années.

David, Meriem, Hervé, Sandrine, Sylvie, je vous remercie d'être parmi les gens sources de ma joie qui n'ont jamais oublié de partager leur sourire avec moi.

Je remercie toutes les personnes responsables du bon déroulement et du contrôle des secteurs d'histologie et de l'animalerie ; **M. GILLET, Astrid, Christelle, Cécile, Lauralie, Annabelle, Jean-marc et Sébastien**.

Je tiens à remercier les **secrétaires**, les **techniciens/nnes** et tous les **personnels** du labo, qui, sans vos tâches on n'aura jamais d'organisation du labo ni de facilité de manipuler. Je vous remercie aussi pour nos discussions.

Le labo, une grande maison rassemblant des frères et sœurs par humanité. Je les remercie tous ; **Xavier, Sajida, Petit Paulo, Petite Dafné, Anne, Benjamin, Elise, Xu, Xiamong, Caroline, Matthieu, Gabriel, Anne-sophie, Fatouma, Marion, Charlène, Xing, Julie, Déborah, Anne-Bé, Isabelle, Emilie, Nadège et Nicolas**.

Dans ce monde, il n'y a pas un homme plus heureux que celui qui converse avec un ami, qui demeure avec un ami, qui s'entretient avec un ami, mais la véritable amitié est rare (*Hitopadésa*). **Reine, Mahdia**, je suis chanceuse d'avoir des amies, des vraies sœurs, comme vous deux. Je souhaite que nous soyons fidèles en amitié jusqu'à la fin malgré la distance et les difficultés. May all your wishes come true....

Dès mon premier jour au labo tu m'as accompagné. T'étais toujours à côté de moi, dans les bons et les mauvais moments. Je ne peux pas oublier toutes les aides et toutes les consignes que tu m'avais donné. **Irfan**, t'es un vrai ami, un vrai frère. May God give you all the best. Et comme tu dis : No merciiii....

MERCI La FRANCE. MERCI NANCY, de m'avoir connu des sœurs Libanaises qu'on n'avait pas la chance de se rencontrer au Liban. Je vous remercie toutes pour les moments qu'on a passés ensemble et du bonheur et de la joie que vous m'avais accordée. Je remercie également la famille de **3ammo Bilal MISSAYKEH**, qui était comme ma deuxième famille. Je vous aime tous.

Remercier les parents et la famille ce n'est pas quelque chose facile parce qu'on va se retrouver, à un moment, sans vocabulaires qui peuvent les décrire.

BABA, tu es la personne la plus précieuse de ma vie. Tu m'as encouragé à atteindre mon but et d'être toujours optimiste. Je suis vraiment fière d'être dans le même domaine que toi. Tu es un repère essentiel et éternel. Qu'ALLAH te protège ya « sanadi ».

MAMA, ya « kell denye ». Il n'y pas quelque chose plus belle de tes prières pour moi et de ton mot « mon amour ». Les plus beaux moments que j'avais passé en France c'était les mois où t'étais avec moi. Tu es un chemin de lumière. Qu'ALLAH te protège ya « habibet zalbi ».

Il était une fois un grand frère qui habitait avec sa petite sœur, c'est Ayman « Aymoun » et moi. J'ai passé toutes mes années avec toi, dès le premier jour de mon arrivé en France. T'étais mon père, ma mère, mon frère et mon ami. L'amour entre frère et sœur c'est le vrai amour, c'est un amour sincère sans intérêts. May all your wishes come true « ya ajmal wa zazaz zakh ».

Jihad « Joujou », malgré la distance et les années qui nous a empêché de se rencontrer, tu es toujours dans mon cœur et dans mon esprit. Tes appels et ton voix me donnent toujours de l'espoir. Tes prières et ceux de ta femme « Jamila » m'ont encouragé à travailler et donner de mon mieux. May all your wishes come true « ya za7la joujou ».

Rania « Rannoun », Rim « Ramroum », avoir des sœurs comme vous deux c'est vivre dans la joie et le bonheur. Vous étiez toujours à côté de moi, avec vos blagues, vos mots, vos cœurs et vos encouragements. I love you to the moon and back. Je ne peux pas imaginer ma vie sans vous deux. Je vous souhaite toute la chance de la vie « ya zagla banoutet ».

Je ne peux pas oublier de remercier ma grande famille pour son soutient et ses encouragements.

Je ne peux pas oublier de remercier une personne (DAB) qui m'avait supporté durant ma dernière année de thèse. Elle était une source de joie et de confiance pour moi. Elle m'a encouragé pour finir ma rédaction et d'avoir toujours de l'espoir. Je te remercie vraiment pour tout et je te souhaite la meilleure chance de la vie.

Aujourd'hui, je tourne une page pour commencer à en écrire une nouvelle

Toujours à côté de vous.

إهداء إلى روح جدتي الطاهرة وفاء الأيوبي و إلى عماتي فاطمة وشهيرة حفظهما الله

Sommaire

LISTE DES ABRÉVIATIONS	7
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	13
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	20
I. La squelettogenèse et le développement ostéoarticulaire	22
I.1 Les éléments squelettiques humains	22
I.2 Les tissus osseux	23
I.2.1 Les différents types cellulaires	25
I.2.2 La matrice extracellulaire osseuse	29
I.3 Les articulations	31
I.4 Le tissu cartilagineux	32
I.5 Ostéogenèse et croissance	34
I.5.1 Ossification intramembranaire.....	34
I.5.2 Ossification endochondrale	35
I.5.2.1 Différentes zones du cartilage de croissance	39
I.5.2.2 Etude structurale des chondrocytes	40
I.5.2.3 Cytosquelette des chondrocytes.....	40
I.5.2.4 Orientation des chondrocytes au sein de la plaque de croissance.....	40
I.5.2.5 Effets de certains facteurs sur l’ossification endochondrale.....	41
I.5.2.5.1 Effets hormonaux	41
I.5.2.5.2 Effets des facteurs sécrétés	43
I.5.2.5.3 Les stimulations biomécaniques	49
I.5.3 Le remodelage osseux.....	50
II. La MEC cartilagineuse et osseuse	53
II.1 Les différentes régions de la MEC cartilagineuse.....	53
II.1.1 Les protéoglycanes (PGs).....	54
II.1.1.1 Les glycosaminoglycanes (GAGs)	57
II.1.1.2 Les différentes familles de PGs	60
II.1.1.2.1 La famille d’agrécane.....	60
II.1.1.2.1.1 L’agrécane	60
II.1.1.2.2 La famille des SLRPs.....	62
II.1.1.2.2.1 La décorine	64
II.1.1.2.2.2 Le biglycan	64

II.1.1.2.3	La famille de syndécans	65
II.1.1.2.4	La famille de glypicans (GPC).....	67
II.1.1.2.5	Le bétaglycan	69
II.2	Les PGs au niveau de la matrice osseuse.....	70
III.	La xylosyltransférase I.....	73
III.1	Localisation chromosomique	74
III.2	Structure de la protéine et sa localisation intra et inter cellulaire.....	74
III.3	Implication de la xylosyltransférase I dans certaines pathologies	75
III.4	Les variants génétiques de la <i>XylTI</i>	76
	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	83
	Modèle animale.....	84
1.	Les souches de souris.....	84
2.	Génotypage des souris <i>Col2a1-CreERTM;XylTI^{fllox/fllox}</i>	84
3.	Soin et élevage des souris.....	85
4.	Injection du tamoxifène.....	85
5.	Morphométrie des souris.....	85
6.	Double coloration au Bleu Alcian (BA) et au Rouge Alizarine (RA) du squelette entier des souris âgées de 4 semaines.....	86
7.	Etude structurale des tissus osseux par la microtomographie à rayon X à haute résolution (High-Resolution Micro Computer Tomography : μ CT).....	86
8.	Etude histologique des tissus cartilagineux et osseux des membres inférieurs des souris <i>Col2a1-CreERTM;XylTI^{fllox/fllox}</i>	87
8.1.	Dissection des genoux et des membres inférieurs.....	87
8.2.	Coloration Tartrate Resistant Acid Phosphate (TRAP) sur des coupes histologiques.....	87
8.3.	Coloration des coupes histologiques des genoux.....	87
8.4.	La microscopie de génération de second harmonique (GSH)	89
8.5.	Hybridation <i>In Situ</i> par RNAscope (HIS).....	89
8.6.	Immunohistochimie (IHC)	90
8.7.	Injection intrapéritonéale de l'inhibiteur de TGF β R1.....	90
	Modèle cellulaire	92
1.	Etude des ostéoblastes dérivés des os longs des souris <i>Col2a1-CreERTM;XylTI^{fllox/fllox}</i>	92
1.1.	Culture des ostéoblastes dérivés des os longs des souris WT et cKO âgées de 6 semaines.....	92

1.2.	Extraction des protéines cellulaires.....	92
1.3.	Western blot.....	92
1.4.	Extraction des ARNm totaux à partir des ostéoblastes en culture.....	93
1.5.	La transcription inverse.....	93
1.6.	La PCR quantitative relative en temps réel (qPCR)	93
2.	Tests statistiques	94
OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....		95
RÉSULTATS.....		98
Impact de l'invalidation de la xylosyltransférase I au niveau des chondrocytes, sur le processus d'ossification endochondrale, la maturation des chondrocytes et l'ostéogenèse dans un modèle de souris postnatales.....		99
1.	Génération de la lignée <i>Col2a1-CreERTM;XylTI^{fllox/fllox}</i>	100
2.	Les souris <i>Col2a1-CreERTM;XylTI^{fllox/fllox}</i> présentent un nanisme prononcé et une réduction importante de la taille de leurs membres supérieurs et inférieurs	103
3.	Les souris <i>Col2a1-CreERTM;XylTI^{fllox/fllox}</i> affichent des différences marquées de leurs éléments squelettiques	108
4.	Les souris adultes <i>Col2a1-CreERTM;XylTI^{fllox/fllox}</i> présentent des défauts structuraux au niveau de leurs os et une résorption osseuse importante	112
5.	Défaut de synthèse des GAGs et désorganisation de la plaque de croissance chez les souris <i>Col2a1-CreERTM;XylTI^{fllox/fllox}</i>	116
6.	Les souris <i>Col2a1-CreERTM;XylTI^{fllox/fllox}</i> présentent un défaut de chondrogenèse et d'ossification.....	119
7.	Les souris <i>Col2a1-CreERTM;XylTI^{fllox/fllox}</i> présentent des défauts d'organisation des fibres de collagènes matricielles dans la plaque de croissance	123
8.	Les souris <i>Col2a1-CreERTM;XylTI^{fllox/fllox}</i> présentent un défaut de maturation des chondrocytes et une augmentation de l'expression des marqueurs ostéogéniques	125
9.	L'implication de la voie de signalisation du TGF-β dans le nanisme, les défauts de chondrogenèse et d'ossification chez les souris <i>Col2a1-CreERTM;XylTI^{fllox/fllox}</i>	129
10.	Dérégulation de la voie de signalisation des Wnts chez les souris <i>Col2a1-CreERTM;XylTI^{fllox/fllox}</i>	134
11.	Impact de l'invalidation du gène <i>XylTI</i> sur l'activité des ostéoblastes dérivés des os longs.....	137
DISCUSSION.....		140
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....		157
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES		161
ARTICLE.....		188

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A

AAA	Anévrisme de l'aorte Abdominale
Acan	Agrécane
ADAMTS	A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs
AIA	Adjuvant-Induced Arthritis
ALP	Alkaline Phosphatase
Axin 2	Axis Inhibition protein 2
α-MEM	alpha Modified Eagle's Medium

B

B3GAT3	Beta-1,3-Glucuronyltransferase 3
BA	Bleu Alcian
BMD	Bone Mineral Density
Bmpr1a	Bone morphogenetic protein receptor type-1A
Bmpr1b	Bone morphogenetic protein receptor type-1B
BMPs	Bone Morphogenetic Proteins
BMU	Basic Multicellular Unit
BSP	Bone Sialoprotein
BV/TV	Bone volume/Tissue volume
β-Glap	Matrix Gla Protein

C

cKO	<i>Knockout</i> conditionnel (muté)
Col10	Collagène de type X
Col2	Collagène de type II
ColIA1	Collagène de type I
CS	Chondroïtin Sulfate
CSM	Cellules Souches Mésenchymateuses
CT.Th	Épaisseur de l'os cortical

D

DBQD	Desbuquois Dysplasia
DHH	Desert Hedgehog
DMP1	Dentin Matrix Protein-1
Dpc	Day post coitum
DS	Dermatan Sulfate

E

EDTA	Acide éthylènediamine tétraacétique
ENU	N-éthyl-N-nitrosourée
ERα	Estrogen Receptor

F

fam20b	Glycosaminoglycan Xylosylkinase, Family with Sequence Similarity 20, Member B
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
Fzd	Frizzled

G

G1, G2, G3	Globular Regions
GAGs	Glycosaminoglycans
GalT-I	β 1,4-galactosyltransférase I
GalT-II	β 1,3-galactosyltransférase II
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GDFs	Growth Differentiation factors
GH	Growth hormone
GlcA	Glucuronic Acid
GlcAT-I	β 1,3-glucuronyltransférase I
GPC	Glypican
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
Gpn-1	Gène du glypican 1
GSH	Génération Second Harmonique

H

HA	Hyaluronic acid
Has	Hyaluronan Synthase
HCC	Human Carcinoma Cells
Hep	Heparin
HES	Coloration trichromique Hématoxyline Eosine Safran
HH	Hedgehog
HIS	Hybridation In Situ
HS	Heparan Sulfate
HSPG	Hepran Sulfate Proteoglycan

I

ICAM-I	Intercellular Adhesion Molecule 1
IGD	Interglobular Domain
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
IGF1R	Insulin-like Growth Factor 1 Receptor
IHC	Immunohistochimie
Ihh	Indian Hedgehog

K

Kif3a	Kinesin Family Member 3A
KO	<i>Knockout</i>
KS	Keratan Sulfate

L

Lon-2	<i>C. elegans</i> Glypican
LP	Link Protein
LRP5	Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein 5
LRP6	Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein 6

M

M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MEC	Matrice Extracellulaire
MMPs	Matrix Metalloproteinases
MPC	Matrice péricellulaire

O

OA	Osteoarthritis
OCN	Ostéocalcine
OPG	Osteoprotégrine
OPN	Ostéopontine
Osx	Osterix

P

PAPS	3'-Phosphoadenosine 5'-Phosphosulfate Synthase
Pax1	Paired box 1
PC1	Polycistin 1
PCP	Planar Cell Polarity

PDZ	Initialisme combinant les premières lettres des trois premières protéines découvertes partageant ce domaine ; P ost synaptic density protein, D rosophila disc large tumor suppressor et Z onula occludens-1 protein
PGs	Protéoglycanes
Ptc	Patched Receptor
PTH	Parathyroid hormone
PTHr1	Parathyroid Hormone Receptor
PTHrP	Parathyroid Hormone-related Peptide
PXE	Pseudoxanthoma elasticum

R

RA	Rouge Alizarine
RANKL	Receptor Activating NF Kappa B Ligand
RE	Réticulum endoplasmique
ROR2	Receptor Tyrosine Kinase Like Orphan Receptor 2
RTH	Resistance to Thyroid Hormone
Runx2	Runt-Related transcription factors 2
Ryk	Receptor tyrosine kinase

S

SDC	Syndécan
SGB	Sympson-Golabi Behmel Syndrom
SHH	Sonic Hedgehog
SIBLING	Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoprotein
SLRPs	Small-Leucin Rich Proteins
SMAD	Fusion entre le gène <i>Sma</i> chez <i>C. elegans</i> avec le gène <i>Mad</i> chez la drosophile
SMI	Structure Model Index
Snorc	Small Novel Rich in Cartilage
SOST	Sclérostine
Sox5	Sex Determining Region Y box-5
Sox6	Sex Determining Region Y box-6
Sox9	Sex Determining Region Y box-9
SSc	Sclérodémie Systemique

T

T₃	Triiodothyronine
T₃-α	T ₃ receptor
T₄	Thyroxine
Tb.N	Trabecular Number
Tb.Pf	Trabecular Bone Pattern Factor
Tb.Sp	Trabecular Separation
Tb.Th	Trabecular Thickness

TGF- β Transforming Growth Factor- β
TGF β R Transforming Growth Factor- β receptor
TM Tamoxifène
TMD Tissue Mineral Density
TSH Thyroid-Stimulating Hormone

V

Vangl2 Van Gogh-Like 2
VEGFs Vascular Endothelial Growth Factors

W

WT Wild-type = Sauvage
Wnt Wingless (sans ailes)/Integrated

X

XT-I Xylosyltransférase I
XT-II Xylosyltransférase II
XylTI Gène de la xylosyltransférase I

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Liste des figures

Figure 1 : Le squelette humain	22
Figure 2 : La structure des os longs	24
Figure 3 : Les différents types cellulaires au niveau de l'os.	25
Figure 4 : La composition de la matrice extracellulaire du tissu osseux	30
Figure 5 : Anatomie d'une articulation synoviale montrant les différentes structures au niveau d'une coupe sagittale des os longs	31
Figure 6 : Les différents types de cartilage	33
Figure 7 : Les différentes étapes de l'ossification intramembranaire	35
Figure 8 : Les différentes étapes de l'ossification endochondrale au niveau d'un os long	36
Figure 9 : Organisation du cartilage de croissance et ses différentes zones	39
Figure 10 : Boucle de rétrocontrôle négative de Ihh/PTHrP	46
Figure 11 : Expression des facteurs de croissance du fibroblaste (FGFs) et de leur récepteurs (FGFRs) pendant le développement de l'os endochondral	48
Figure 12 : Modèle d'organisation en colonne des chondrocytes de la plaque de croissance due aux différentes résistances mécaniques de la MEC	49
Figure 13 : Le remodelage osseux est contrôlé par le cycle de remodelage osseux	51
Figure 14 : Illustration schématique des constituants moléculaires du cartilage et de leur disposition en grands assemblages multimoléculaires	55
Figure 15 : Classification des PGs	56

Figure 16 : Différentes étapes de synthèse des GAGs (CS, HS, DS et heparine)	59
Figure 17 : Représentation schématique de la structure de l'agrécan.	62
Figure 18 : Les domaines structurels des SLRPs.....	63
Figure 19 : Schéma de la structure de décorine.....	64
Figure 20 : Double rôle de la famille des SDCs membranaires.....	66
Figure 21 : Effets de GPC3 sur la signalisation cellulaire.....	68
Figure 22 : Structure du bétaglycan.....	69
Figure 23 : Représentation schématique de la biosynthèse des chaînes de GAGs par les différentes glycosyltransférases	73
Figure 24 : Structure cristalline du complexe XT-I, UDP-xylose et un peptide accepteur humain	74
Figure 25 : Changements phénotypiques du squelette crâniofaciale chez les larves des poissons zèbres mutées pour la <i>XylT1</i> et la <i>fam20b</i> évaluée par coloration au bleu Alcian et au rouge Alizarine.....	77
Figure 26 : Caractéristiques phénotypiques de deux patients montrant une mutation homozygote R481W, pour la <i>XylT1</i>	78
Figure 27 : Réduction de la taille des éléments squelettiques des souris <i>pug</i>	79
Figure 28 : Caractéristiques cliniques d'un patient atteint du Desbuquois dysplasia de type II (DBQD2) portant une mutation au niveau de la <i>XylT1</i> dans son génome.	80
Figure 29 : Anomalies squelettiques d'un patient atteint du Desbuquois dysplasia de type II (DBQD2) portant une mutation au niveau de la <i>XylT1</i> , évaluées par Rayon-X.....	81

Figure 30 : Vue générale du déroulement de l'hybridation In Situ en utilisant la technique de RNAscope de chez ACD.....	90
Figure 31 : Schéma illustrant la stratégie de construction et de croisement des souris <i>knockout</i> conditionnelles ainsi que la position des différentes amorces utilisées pour chaque allèle.....	101
Figure 32 : Représentation schématique de la génération des souris <i>Col2a1-CreERTM;XylTI^{flox/flox}</i>	102
Figure 33 : Représentation schématique des injections intrapéritonéales chez les souris postnatales.....	104
Figure 34 : Mesure du poids corporel des souris âgées de 1, 4 et 8 semaines.....	104
Figure 35 : Réduction de la taille du corps et de la queue des souris <i>Col2a1-CreERTM;XylTI^{flox/flox}</i> à différents âges	105
Figure 36 : Réduction de la taille du corps entier et des éléments squelettiques des souris <i>Col2a1-CreERTM;XylTI^{flox/flox}</i> âgées de 8 semaines.	106
Figure 37 : Taille du corps des souris <i>Col2a1-CreERTM</i> âgées de 4 semaines.....	107
Figure 38 : Changements phénotypiques des souris <i>Col2a1-CreERTM;XylTI^{flox/flox}</i> âgées de 4 semaines.....	109
Figure 39 : Changements phénotypiques des éléments du squelette appendiculaire des souris <i>Col2a1-CreERTM;XylTI^{flox/flox}</i> âgées de 4 semaines.	110
Figure 40 : Changements phénotypiques des disques intervertébraux et de la cage thoracique des souris <i>Col2a1-CreERTM;XylTI^{flox/flox}</i> âgées de 4 semaines.	111
Figure 41 : Microtomographie à rayons X (μ CT) des os longs des souris <i>Col2a1-CreERTM;XylTI^{flox/flox}</i> et sauvages âgées 8 semaines.....	113
Figure 42 : Résorption osseuse importante chez les souris <i>Col2a1-CreERTM;XylTI^{flox/flox}</i>	115

Figure 43 : Des études histologiques du cartilage articulaire des souris âgées de 8 semaines	117
Figure 44 : Etudes histologiques de la plaque de croissance des souris âgées de 8 semaines..	118
Figure 45 : Etudes histologiques de la plaque de croissance des souris cKO et WT âgées de 4 semaines	121
Figure 46 : Etudes histologiques de la plaque de croissance des souris sauvages et mutées âgées de 10 jours.....	122
Figure 47 : Analyse des fibres du collagène matricielle de la plaque de croissance chez les souris <i>Col2a1-CreERTM;XylTI^{fllox/fllox}</i> et WT âgées de 8 semaines.	124
Figure 48 : Analyse de l'expression des gènes de la chondrogenèse et de la MMP13 chez les souris âgées de 4 semaines.	126
Figure 49 : Analyse de l'expression des gènes de l'ossification chez les souris âgées de 4 semaines	127
Figure 50 : Analyse de l'expression des gènes spécifiques de la différenciation hypertrophique et de l'ossification chez les souris âgées de 10 jours.....	128
Figure 51 : Les voies de signalisation canoniques et non canoniques du TGF-β impliquées dans la formation du cartilage et son maintien.....	130
Figure 52 : Analyse par immunohistochimie de l'expression du récepteur TGFβR2 et du pSmad2 au niveau du tibia des souris âgées de 10 jours	131
Figure 53 : Analyse par immunohistochimie de l'expression des récepteurs TGFβR3 au niveau du tibia des souris âgées de 10 jours.....	132
Figure 54 : Etude de l'effet d'injection de l'inhibiteur du TGFβR1 chez les souris cKO.	133
Figure 55 : Implication de la voie de signalisation de WNT dans la chondrogenèse	135

Figure 56 : Analyse de l'expression de Wnt4 et Wnt5b au niveau du tibia des souris cKO et WT âgées de 10 jours par immunohistochimie.....	135
Figure 57 : Effet de l'inactivation de la <i>XylTI</i> sur l'activité des ostéoblastes.....	138
Figure 58 : Dérégulation de la voie de signalisation de Wnt chez les ostéoblastes des souris mutées.	139
Figure 59 : Schéma récapitulatif de l'effet de déficience en XT-I sur la chondrogenèse, le processus d'ossification endochondrale et le remodelage osseux	160

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les différentes caractéristiques des ostéoblastes et des cellules de lissage osseux ..	27
Tableau 2 : Effets de la voie de signalisation des Wnts sur la différenciation des chondrocytes et leurs hypertrophies.....	47
Tableau 3 : Tableau représentant les différents groupes de GAGs, leurs unités disaccharidiques et leurs caractéristiques.....	58
Tableau 4 : Tableau représentant la distribution tissulaire des SLRPs et le phénotype des souris <i>knockout</i> déficientes en certains membres de cette famille	63
Tableau 5 : Tableau représentant les différents membres de la famille des Glypicans, leurs localisations chromosomiques et le nombre d'acides aminés qui les constituent, chez l'homme et les drosophiles.....	67
Tableau 6 : Les variants génétiques de la <i>XylTI</i> reportés chez les patients atteints du Desbuquois dysplasia de type II (DBQD2) ainsi que l'effet de certains variants sur l'activité et l'expression de la XT-I.....	84
Tableau 7 : Les séquences d'amorces utilisées dans le génotypage des souris : <i>Col2a1-CreERTM</i> , <i>XYylTI-cKO</i> et <i>Col2a1-CreERTM/XylTI-cKO</i>	84
Tableau 8 : Tableau représentant les différentes séquences des amorces utilisées dans la RT-qPCR.....	94

Tableau 9 : Analyse quantitative des paramètres histomorphométriques dynamiques et statiques au niveau des fémurs des souris *Col2a1-CreERTM;XylTI^{flox/flox}* et sauvages âgées de 8 semaines114

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

***La squelettogenèse et le
développement ostéoarticulaire***

I. La squelettogenèse et le développement ostéoarticulaire

I.1 Les éléments squelettiques humains

Le squelette est un organe **hautement dynamique** qui subit constamment des changements et de la régénération. C'est un système complexe qui représente environ 15% de la masse corporelle et qui assure des fonctions structurales et métaboliques.

Son développement se réfère au développement des éléments squelettiques qui débute dès les premiers jours de la vie intra-utérine et qui se poursuit jusqu'à ce que les os atteignent un développement complet à la fin de la puberté.

Le squelette humain adulte comporte 213 os au total sans compter les os **sésamoïdes**, qui se divisent en 6 os formant les **osselets auditifs**, 126 os constituant le squelette **appendiculaire** et 74 os constituant le squelette **axial** (Driscoll et al. 2006 ; Clarke, 2008) et les **articulations** (Figure 1 A).

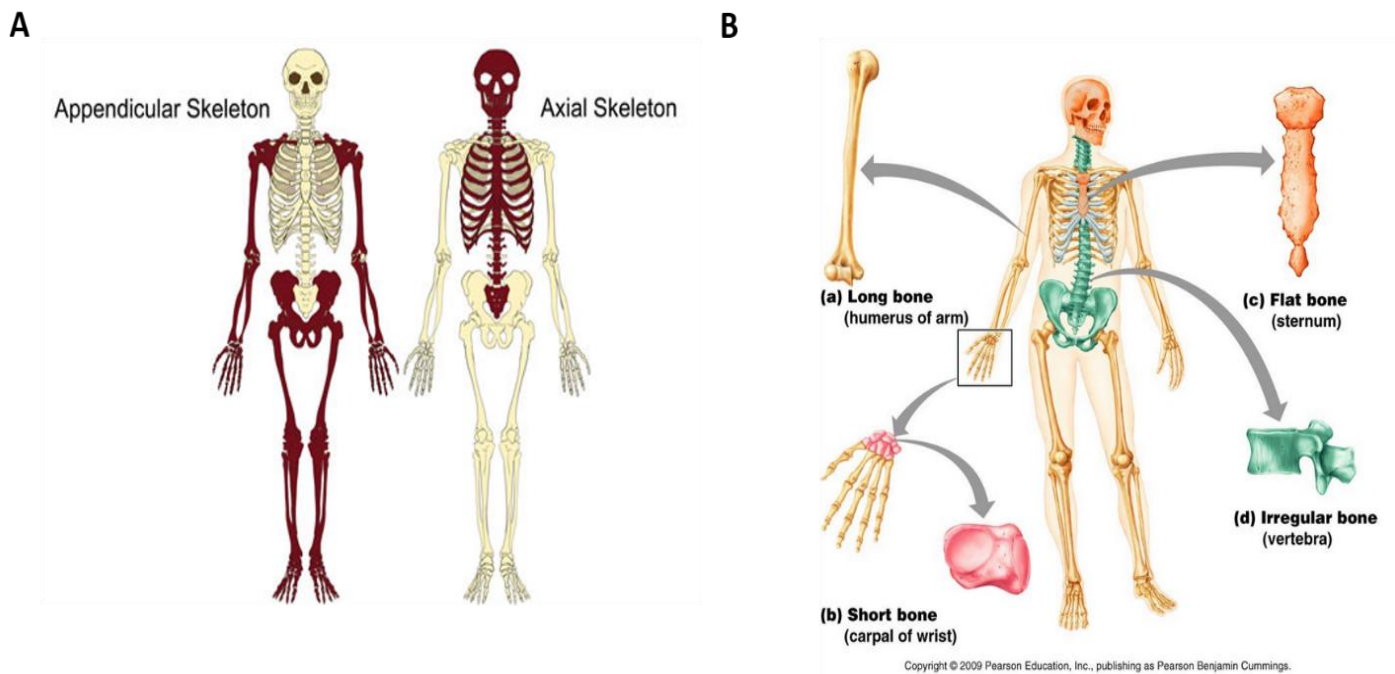


Figure 1 : Le squelette humain. *A- Les deux parties essentielles du squelette : le squelette appendiculaire qui forme les extrémités des bras et des jambes, le squelette axial qui est le noyau central du corps. B- Classification des os selon leur morphologie (http://www.teachpe.com/anatomy/skeleton_axial.php).*

I.2 Les tissus osseux

Il existe 4 catégories générales d'os : les os longs, les os courts, les os plats et les os irréguliers (Figure 1 B). Il s'agit d'un tissu conjonctif complexe qui possède des caractéristiques bien spécifiques :

C'est un tissu qui a la particularité de **se minéraliser**, ceci confère à l'os ses propriétés de banque minérale et de soutien mécanique de l'organisme.

C'est un tissu **très dynamique** qui englobe quatre types cellulaires : les ostéoblastes, les cellules bordantes, les ostéocytes et les ostéoclastes. Il est considéré comme l'unique organe dans le corps qui possède, les ostéoclastes, des cellules dont le rôle majeur est de détruire ou résorber le tissu osseux. Cette réaction pseudo-auto-immune de résorption permet non seulement, la formation des os, phénomène appelé modelage osseux, mais aussi agit en cas de lésions afin d'entretenir le capital osseux (processus de remodelage osseux).

C'est un tissu **très richement innervé**. C'est ainsi que des travaux récents montrent que le remodelage osseux est modulé par le système nerveux autonome via un ensemble de neurotransmetteurs dont les récepteurs sont exprimés par les ostéoblastes (Elefteriou et al., 2014).

Le squelette assure plusieurs fonctions vitales parmi lesquels : le déplacement des muscles adjacents, la protection des organes internes, la locomotion, le stockage du calcium et du phosphate, la maintenance de l'homéostasie des minéraux et de la balance acide-base, un réservoir des facteurs de croissance et de cytokines et fournit un environnement pour l'hématopoïèse dans les espaces de la moelle osseuse (Clarke, 2008 ; Florencio-Silva et al., 2015).

Le squelette **consomme de grandes quantités d'énergie** afin d'assurer toutes ces fonctions, ce qui implique que son activité soit strictement coordonnée avec le métabolisme énergétique global. En effet, des études récentes ont montré l'implication de l'os dans la régulation du métabolisme du glucose (Kanazawa, 2017).

L'os préserve différentes structures : les cavités de résorption, les lacunes et les ostéones (système Haversien) qui caractérisent les os compacts, les lamelles ainsi que les os spongieux ou trabéculaire. **Les os compacts** sont des structures solides et denses qui entourent la cavité médullaire et représentent 80% du squelette, tandis que **les os trabéculaires** sont composés de réseaux de plaques trabéculaires et des bâtonnets intercalés dans le compartiment de la moelle osseuse ressemblant ainsi à un nid d'abeilles et représentant 20% du squelette humain adulte (Clarke, 2008) (Figure 2).

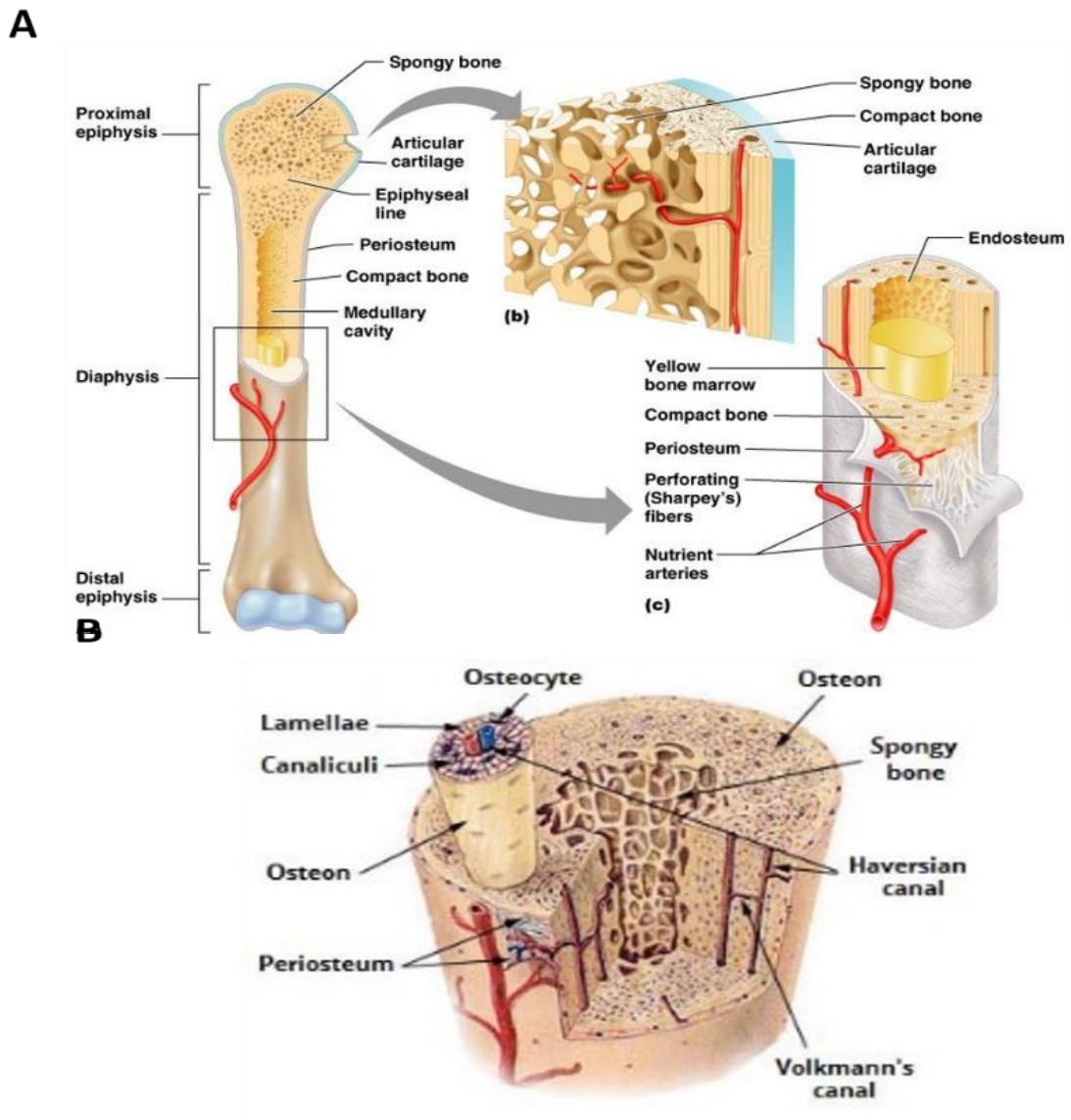


Figure 2 : La structure des os longs. A- Anatomie de la structure de l'os long humain B- Structure microscopique de l'os compact et trabéculaire (<http://tweetboard.me/anatomy-of-bone-cells/>).

I.2.1 Les différents types cellulaires

Le développement et le maintien de l'homéostasie osseuse nécessitent une corrélation entre l'activité de plusieurs types cellulaires : les ostéoblastes, les ostéoclastes, les ostéocytes et les cellules de lissage des os, qui existent au niveau des tissus osseux (Figure 3). Chacun d'entre eux est caractérisé par une morphologie distincte, un rôle spécifique, et une expression génétique définie.

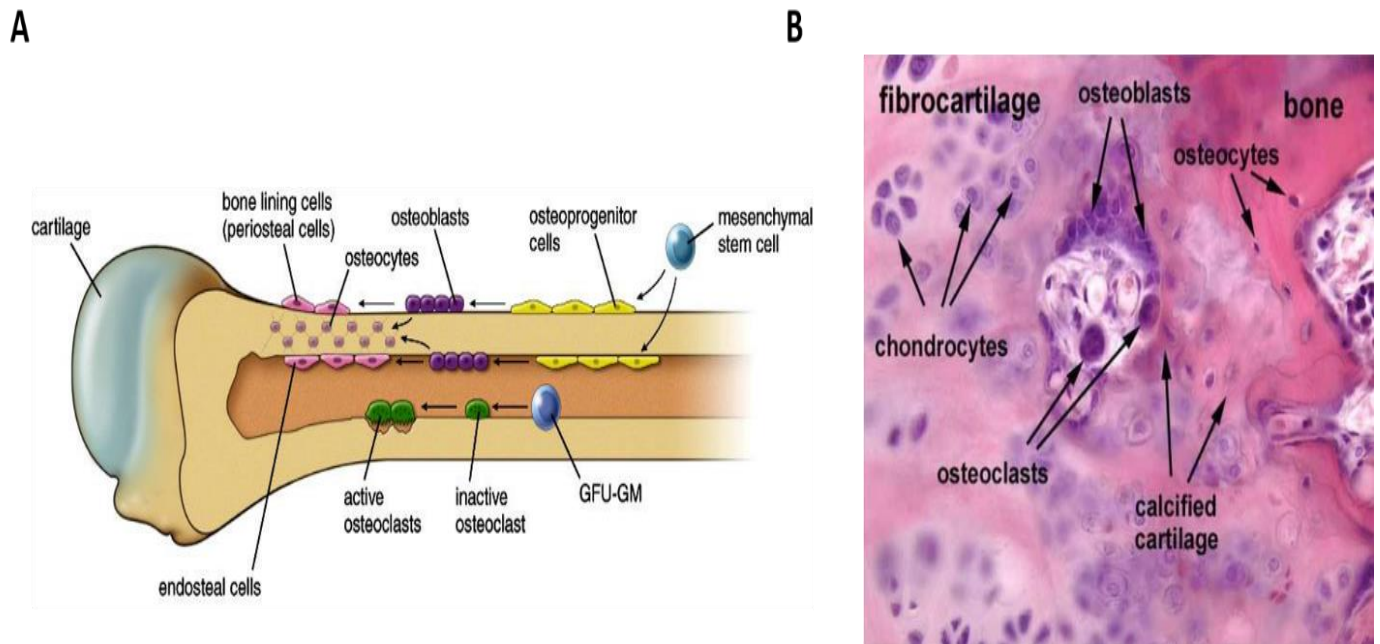


Figure 3 : Les différents types cellulaires au niveau de l'os. *A- Vue schématique des différents types cellulaires qui participent à la formation et à la résorption osseuse. B- Identification des cellules par vue microscopique sur une coupe histologique colorée en HES (Histology - Bone and cartilage).*

En premier lieu, les **ostéoblastes**. Ce sont des cellules ostéoprogénitrices de forme cuboïde qui se localisent tout le long de la surface osseuse (Capulli et al., 2014). Elles dérivent des cellules souches mésenchymateuses (CSM) (Capulli et al., 2014) et des chondrocytes hypertrophiques (Yang et al., 2014 ; Aghajanian and Mohan, 2018). Elles sont impliquées dans la **synthèse** d'une nouvelle matrice osseuse. Il a été montré que les ostéoblastes dérivés des os axiaux et ceux dérivés des os appendiculaires répondent d'une manière différente aux signaux mécaniques, hormonaux et aux cytokines (Clarke, 2008).

La différenciation des préostéoblastes en ostéoblastes nécessite un changement de leur morphologie et du programme génétique. C'est le cas du gène Runt-Related transcription factors 2 (**Runx2**) qui est considéré comme le gène maître de cette différenciation (Ducy et al., 1997 ; Capulli et al., 2014). Il a été montré que Runx2 favorise la surexpression de certains gènes comme *Col1A1* (Collagène de type 1), *ALP* (Alcaline

phosphatase), *BSP* (Bone sialoprotein), *β -Glap* (bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein) (Zhao et al., 2005 ; Fakhry et al., 2013). Des études réalisées sur une souris déficiente en *Runx2* spécifiquement au niveau des ostéoblastes, montrent des effets remarquables sur le développement squelettique postnatale sans avoir des effets sur le développement embryonnaire (Adhami et al., 2015). Non seulement les changements génétiques et morphologiques caractérisent la différenciation des préostéoblastes mais aussi les facteurs de croissances (FGFs) jouent un rôle clé dans ce processus. En effet des souris *knockout* pour le gène FGF-2 présentent une baisse de la masse osseuse d'une part et une augmentation des adipocytes dans la moelle osseuse d'autre part, ce qui indique l'implication des FGFs dans la différenciation des ostéoblastes (Montero et al., 2000). En outre, il a été démontré que le FGF-18 stimule la différenciation d'une façon autocrine (Hamidouche et al., 2010). Une fois les ostéoblastes sont matures, soit ils subissent l'**apoptose**, soit ils se transforment en **ostéocytes** ou bien en cellules de **lissage** des os (Jilka et al., 1998 ; Franz-Odenaal et al., 2006 ; Matic et al., 2016).

En deuxième lieu, les **ostéocytes**. C'est le type cellulaire le plus abondant. Il représente environ 90-95% des cellules totales dans l'os et ont une durée de vie d'environ 25 ans (Franz-Odenaal et al., 2006). Ils sont définis par leur morphologie, leur localisation et leurs fonctions importantes au niveau de l'os. Ils ont une forme fusiforme et ils sont logés dans des cavités creusées dans la matrice osseuse minéralisée.

Les ostéocytes sont des cellules issues des cellules souches mésenchymateuses et des ostéoblastes qui subissent une étape finale de transition en ostéocytes lors de la formation de l'os (Franz-Odenaal et al., 2006). Une fois ces cellules matures et totalement entourées par une matrice osseuse minéralisée, plusieurs marqueurs spécifiques des ostéoblastes seront moins exprimés parmi lesquels, *OCN*, *BSP*, *Coll* et *ALP*, alors que les marqueurs spécifiques des ostéocytes seront plus exprimés. C'est le cas de *DMPI* (Dentin matrix protein 1) et de la sclérostine (*SOST*) (Bonewald, 2011).

Les ostéocytes jouent plusieurs rôles importants lors du remodelage osseux. Ils agissent comme de **mécano-capteurs** de pressions via un système de réseaux d'interconnexions favorisant ensuite l'adaptation de l'os aux forces mécaniques (Takano-Yamamoto, 2014 ; Wise and King, 2008). De plus, il a été montré que leur apoptose sert de **signal chimiotactique** aux ostéoclastes lors de la résorption osseuse (Noble et al., 1997 ; Aguirre et al., 2006). De là, les ostéocytes sont considérés comme le **chef d'orchestre** du remodelage osseux.

En troisième lieu, les **cellules bordantes**. Ces cellules osseuses sont des **ostéoblastes quiescents** de forme plate qui recouvrent les surfaces osseuses, où ni la résorption osseuse ni la formation osseuse ne se

produisent (Matic et al., 2016). Les fonctions des cellules de la muqueuse osseuse ne sont pas complètement élucidées, mais il a été démontré que ces cellules **empêchent l'interaction** directe entre les ostéoclastes et la matrice osseuse, quand la résorption osseuse ne doit pas se produire. De plus, ces cellules participent à la différenciation des ostéoclastes en produisant l'OPG (Ostéoprotégrine) et le RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand) (Xiong and O'Brien, 2012).

En 2002, des études menées sur ces cellules ont montrées leur implication dans une série d'activités cruciales pour le remodelage osseux parmi lesquelles **le nettoyage du fond des lacunes** des restes osseux qui s'avère être une condition préalable au dépôt ultérieur d'une première couche de protéines (collagènes) dans les puits de résorption (Everts et al., 2002). Le tableau 1 (Everts et al., 2002) représente les différentes caractéristiques des ostéoblastes et des cellules de lissage osseux (cellules bordantes).

	<i>Osteoblast</i>	<i>Bone lining cell</i>
Morphological aspect		
Associated with bone	Yes	Yes
Cell shape	Round	Flattened
Nucleus	Round	Flattened
rER and Golgi	Extensive	Moderate
Secretory granules	Abundant	Sparse
Collagen		
Enwrapment	Absent	Abundant
Functional aspect		
Collagen resorption	-	+
Protein expression		
Alkaline phosphatase	+	+
Type I collagen	++	+/-
Osteocalcin	+	-
ICAM-1	-	+

Tableau 1 : Les différentes caractéristiques des ostéoblastes et des cellules de lissage osseux.

+ *Présence* - *Absence* (Everts et al., 2002).

Finalement, **les ostéoclastes** sont des cellules multinucléées de **différenciation terminale**, qui proviennent de cellules mononucléaires de la lignée des cellules souches hématopoïétiques, sous l'influence de plusieurs facteurs. Parmi ces facteurs, le facteur stimulant les colonies de macrophages (M-CSF), sécrété par les ostéoblastes et les cellules ostéoprogénitrices, et le ligand RANKL, sécrété par les ostéoblastes, les ostéocytes et les cellules stromales (Teitelbaum and Ross, 2003 ; Crockett et al., 2011).

Par ailleurs, les ostéoclastes présentent plusieurs fonctions. C'est ainsi qu'il a été montré que les ostéoclastes produisent des facteurs appelés **clastokines** qui contrôlent les ostéoblastes pendant le cycle de remodelage osseux (Teti, 2013).

Une autre preuve indique que les ostéoclastes peuvent également réguler directement la **niche des cellules souches hématopoïétiques** (Mansour et al., 2012 ; Charles and Aliprantis, 2014). Ces résultats montrent que les ostéoclastes ne sont pas seulement des cellules de résorption osseuse, mais aussi une source de cytokines qui influencent l'activité des autres cellules.

I.2.2 La matrice extracellulaire osseuse

En ce qui concerne la synthèse de la matrice osseuse, elle se fait selon deux étapes essentielles : la déposition de la matrice organique suivie par la minéralisation de cette matrice (Anderson, 2003).

La matrice organique contient les protéines collagéniques (90%), principalement le collagène de type I, et les protéines non collagéniques parmi lesquelles, l'ostéocalcine, l'ostéopontine, l'ostéonectine, la fibronectine, la sialoprotéine osseuse de type II, les BMPs (bone morphogenetic proteins) et les facteurs de croissance (Farbod et al., 2014) (Figure 4). Elle renferme également des petits protéoglycanes riches en leucines (SLRPs) comprenant la décorine, le biglycan, le lumican, l'ostéoadhérine, la fibromoduline et l'ostéoglycine (Nikitovic et al., 2012) . Cette matrice fournit la **flexibilité** des tissus osseux.

D'autre part, **la matrice inorganique** est constituée principalement des ions de phosphate et de calcium. Ces deux ions forment une nucléation afin de favoriser la formation des cristaux d'hydroxyapatite qui, avec le collagène et les protéines matricielles non collagéniques, forment un échafaudage pour la déposition de ces cristaux (Figure 4). Cette association est responsable de la **rigidité** et de la **résistance** du tissu osseux (Datta et al., 2008).

L'analyse protéique des os décalcifiés suggère la présence de plus de 100 protéines dans la matrice extracellulaire osseuse (Salmon et al., 2013). Des analyses similaires réalisées sur les ostéoblastes ont montré que les protéines matricielles représentent environ 30% des 315 protéines identifiées via l'analyse du sécrétome (Kim et al., 2013).

La matrice osseuse est considérée, alors, comme **une structure hautement organisée** qui joue un rôle non seulement **structural** en favorisant l'adhésion cellulaire et le support tissulaire (soutien mécanique), mais joue également un rôle **dynamique** dans la fonction cellulaire, la morphogenèse tissulaire en régulant l'homéostasie osseuse (Walsh, 2015). C'est ainsi que le collagène joue un rôle critique dans la structure et la fonction du tissu osseux (Viguet-Carrin et al., 2006).

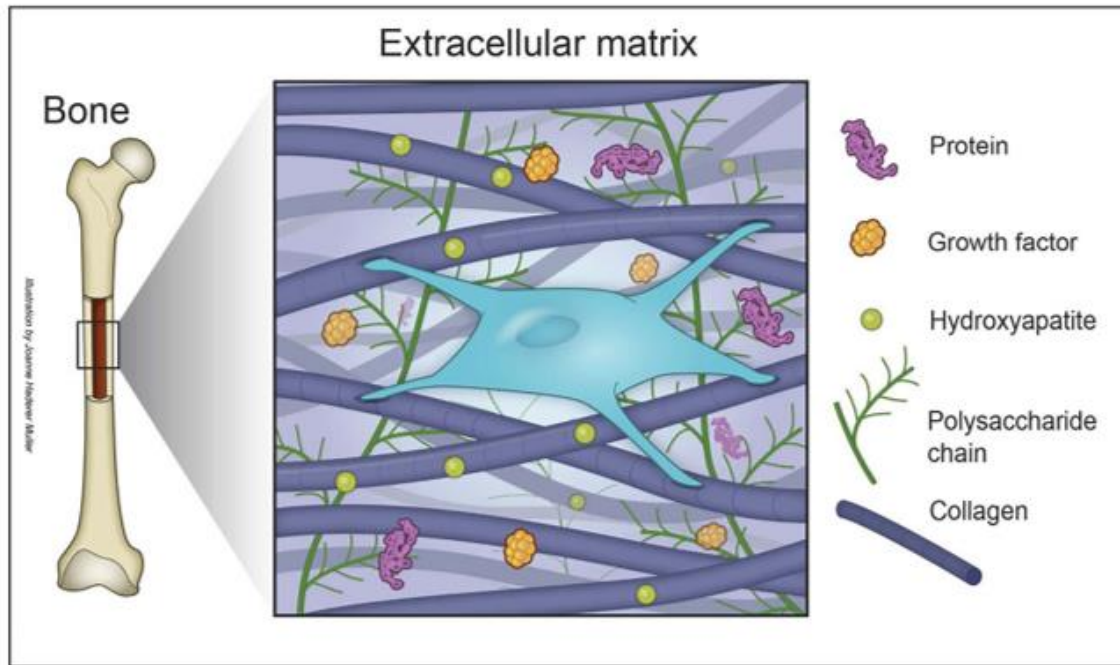


Figure 4 : La composition de la matrice extracellulaire du tissu osseux (*Gaharwar et al., 2016*)

I.3 Les articulations

Les os sont reliés entre eux par une structure appelée **articulation**. Les articulations sont classées en trois catégories selon leurs fonctions : les articulations **mobiles**, **semi-mobiles** et **fixes**. L'articulation est considérée comme une **entité fonctionnelle** comportant plusieurs composants : le cartilage, la capsule articulaire, la synoviale, l'os sous-chondral et la cavité articulaire (un espace entre l'os caractérisant les articulations synoviales). L'articulation est formée de deux extrémités osseuses recouvertes d'un cartilage hyalin ou cartilage articulaire, enfermées dans un sac ou capsule articulaire dont la face interne, intra-articulaire, est tapissée par la membrane synoviale (Figure 5). Une articulation assure deux fonctions principales : d'une part, elle confère **une importante mobilité** qui permet d'assurer les mouvements et d'autre part elle **réduit la friction** des os pendant ce mouvement (amortisseur de chocs).

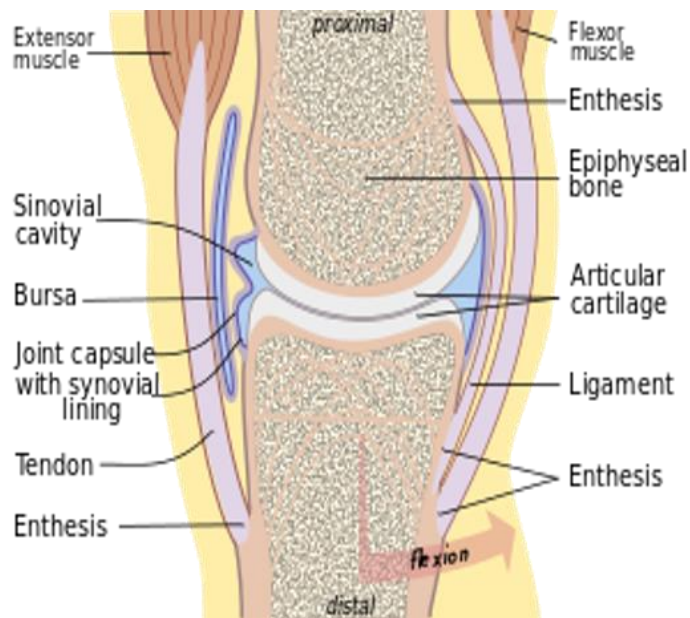


Figure 5 : Anatomie d'une articulation synoviale montrant les différentes structures au niveau d'une coupe sagittale des os longs (<https://en.wikipedia.org/wiki/Joint>).

I.4 Le tissu cartilagineux

Le tissu cartilagineux est un tissu conjonctif spécialisé comprenant un seul type cellulaire, les **chondrocytes**. Ces cellules spécialisées sont logées dans des logettes appelés les lacunes et séparées par une matrice extracellulaire abondante. Les chondrocytes sont principalement d'origine mésodermique et sont les seuls constituants cellulaires du cartilage normal (Kinder et al., 1999 ; Craft et al., 2013).

Le cartilage n'est **ni innervé, ni vascularisé**, la nutrition se fait donc par la périphérie. Alors que de nombreuses macromolécules ont été identifiées dans le cartilage, ses principaux constituants sont le collagène de type II et l'agrécan, un protéoglycane agrégeant (Zaia et al., 2000 ; Patterson-kane and Firth, 2014).

Le cartilage élastique et le cartilage fibreux sont entourés d'une membrane fibreuse connue sous le nom de périchondre. Ce périchondre est similaire au périoste dans sa structure et sa fonction. Le cartilage articulaire ne possède pas de périchondre et donc sa régénération après blessure est difficile.

La différenciation terminale des chondrocytes détermine le caractère et le type du cartilage final. Ainsi, il existe trois types de cartilage : le cartilage hyalin, le cartilage fibreux et le cartilage élastique (Figure 6) (Cartilage and Its Types : Human Anatomy).

- Le cartilage **hyalin** : est caractérisé par des fibres très fines. Ce type de cartilage constitue le cartilage articulaire des os longs, du sternum, des côtes, etc. Sa couleur est blanche bleutée et il est flexible. Il fournit un support rigide mais flexible et réduit la friction entre les surfaces osseuses.
- Le cartilage **fibreux** : est caractérisé par la présence de nombreuses fibres blanches. Il est présent dans la symphyse pubienne et dans l'articulation sternoclaviculaire. Sa couleur est blanche brillante et son aspect est opaque. Ce type de cartilage résiste à la compression, empêche le contact os-os et limite le mouvement relatif.
- Le troisième type de cartilage possède de nombreuses fibres **élastiques** jaunes. Il est présent dans le pavillon de l'oreille, le méat auditif externe, les trompes d'Eustache, l'épiglotte, etc. Sa couleur est jaunâtre et son apparence est opaque. Il fournit un soutien mais tolère aussi la distorsion sans dommage et retourne à sa forme originale après une activité.

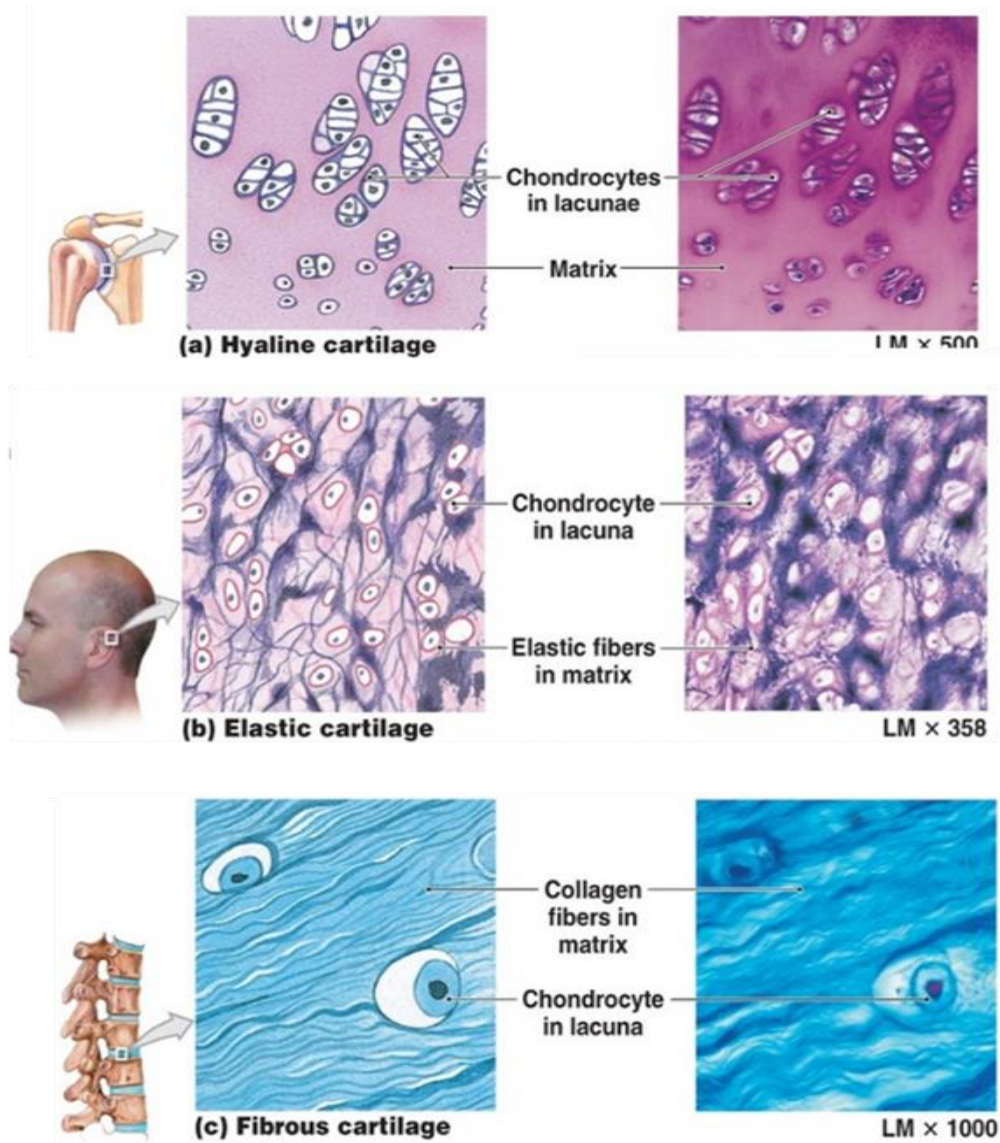


Figure 6 : Les différents types de cartilage. (a)- Cartilage hyalin au niveau du genou. (b)- Cartilage élastique au niveau de l'oreille. (c)- Cartilage fibreux au niveau des disques intervertébrales (Cartilage types and anatomy and physiology).

I.5 Ostéogenèse et croissance

Au cours du développement fœtal et de la croissance postnatale, chaque élément squelettique croît en **longueur** ainsi qu'en **largeur**, concomitamment aux phénomènes d'ossification. L'origine embryonnaire de ces tissus osseux est le mésoderme, à l'exception du squelette crâniofacial qui lui est issu en partie du neuro-ectoderme (Knight and Schilling, 2013). Deux types d'ostéogenèse contribuent à la croissance et le développement squelettique : l'ossification **intramembraneuse** et l'ossification **endochondrale**. Leur point de départ est la condensation à partir de progéniteurs mésenchymateux - des amas de cellules qui adhèrent à travers l'expression des molécules d'adhésion - qui sont communs aux ostéoblastes et aux chondrocytes, et par la suite appelés progéniteurs ostéochondraux. Dès les premières semaines de la vie embryonnaire, ces cellules mésenchymateuses se divisent activement afin d'élaborer une matrice fondamentale riche en collagènes et protéoglycanes. Leur condensation permet ensuite la mise en place d'une ébauche primitive du tissu osseux (Hall and Miyake, 2000).

I.5.1 Ossification intramembranaire

L'ossification **intramembranaire** est la forme caractéristique de la formation des **os plats du crâne** et de **la carapace** de la tortue. Au cours de l'ossification intramembranaire du crâne, les cellules mésenchymateuses dérivées de la crête neurale prolifèrent et se condensent en nodules compacts. Certaines de ces cellules se développent en capillaires ; d'autres changent de forme pour devenir des ostéoblastes. Les ostéoblastes sécrètent une matrice collagène-protéoglycanes, surtout le **collagène de type I**, capable de lier les sels de calcium. Grâce à cette liaison, la matrice pré-os (ostéoïde) devient calcifiée. Dans la plupart des cas, les ostéoblastes sont séparés de la région de calcification par une couche de matrice ostéoïde qu'ils sécrètent. Parfois, les ostéoblastes sont piégés dans la matrice calcifiée et deviennent des ostéocytes. À mesure que la calcification se poursuit, des spicules osseux rayonnent de la région où l'ossification a commencé. De plus, toute la région des spicules calcifiés est entourée de cellules mésenchymateuses compactes qui forment le périoste (la membrane qui entoure l'os). Les cellules de la surface interne du périoste deviennent également des ostéoblastes et déposent une matrice ostéoïde parallèle à celle des spicules existants. De cette manière, de nombreuses couches d'os sont formées (Gilbert, 2000) (Figure 7).

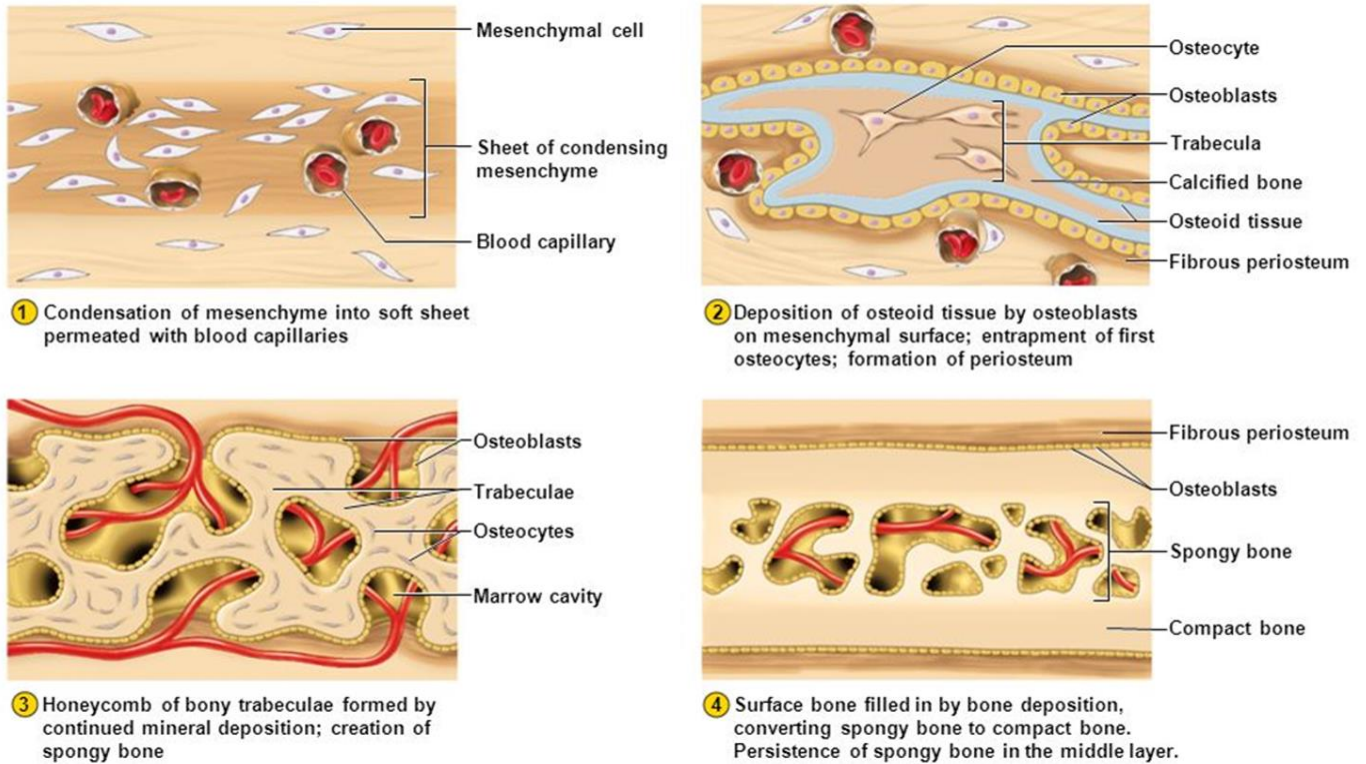


Figure 7 : Les différentes étapes de l'ossification intramembranaire. (1)- Condensation des cellules souches mésenchymateuses en une feuille souple imprégnée de capillaires sanguins. (2)- Déposition des ostéoïdes par les ostéoblastes, piégeage du premier ostéocyte et formation du périoste. (3)- Création d'os spongieux par un dépôt continu des minéraux. (4)- Formation d'os compact entourant une couche d'os trabéculaire (Steemit beta).

I.5.2 Ossification endochondrale

C'est la forme d'ossification **majeure** des tissus osseux responsable de la genèse et de la croissance en **longueur** des os longs, des vertèbres et des os de la base du crâne. Dans ce type de condensation les cellules mésenchymateuses deviennent des **chondrocytes** ; les cellules primaires du tissu cartilagineux qui sont à la frontière des condensations forment le périchondre. Ces chondrocytes ont une forme caractéristique, sécrètent une matrice riche en collagène de type II et en protéoglycanes en particulier 'l'**agrécan**', et expriment un programme génétique caractéristique dirigé par Sox9 (Sex Determining Region Y box-9) et d'autres facteurs de transcription.

Sox9 est exprimé par les cellules mésenchymateuses en condensation et par les chondrocytes proliférantes, mais pas par les cellules hypertrophiques (Akiyama et al., 2002). Ce facteur de transcription est essentiel pour convertir les cellules mésenchymateuses en chondrocytes, il agit à chaque stade de la différenciation chondrocytaire et il est nécessaire dans le maintien de la survie des chondrocytes. Par conséquent, en son absence, la chondrogenèse est bloquée (Hargus et al., 2008). Sox9 active directement les marqueurs de différenciation des chondrocytes et induit l'expression de Sox5 (Sex Determining Region Y box-5) et Sox6 (Sex Determining Region Y box-6) (Akiyama et al., 2002), qui fonctionnent ensemble pour activer le programme de différenciation des chondrocytes.

Dans ce type de processus, d'une part, les chondrocytes se multiplient et synthétisent la matrice cartilagineuse, et d'autre part, cette matrice cartilagineuse est progressivement remplacée par de l'os, contribuant ainsi à l'accroissement en taille de la pièce squelettique. La transformation du modèle cartilagineux en os définitif de l'adulte débute chez l'embryon et se termine après la puberté. Il comporte plusieurs étapes étroitement imbriquées et qui peuvent être divisés en cinq étapes essentielles (Figure 8).

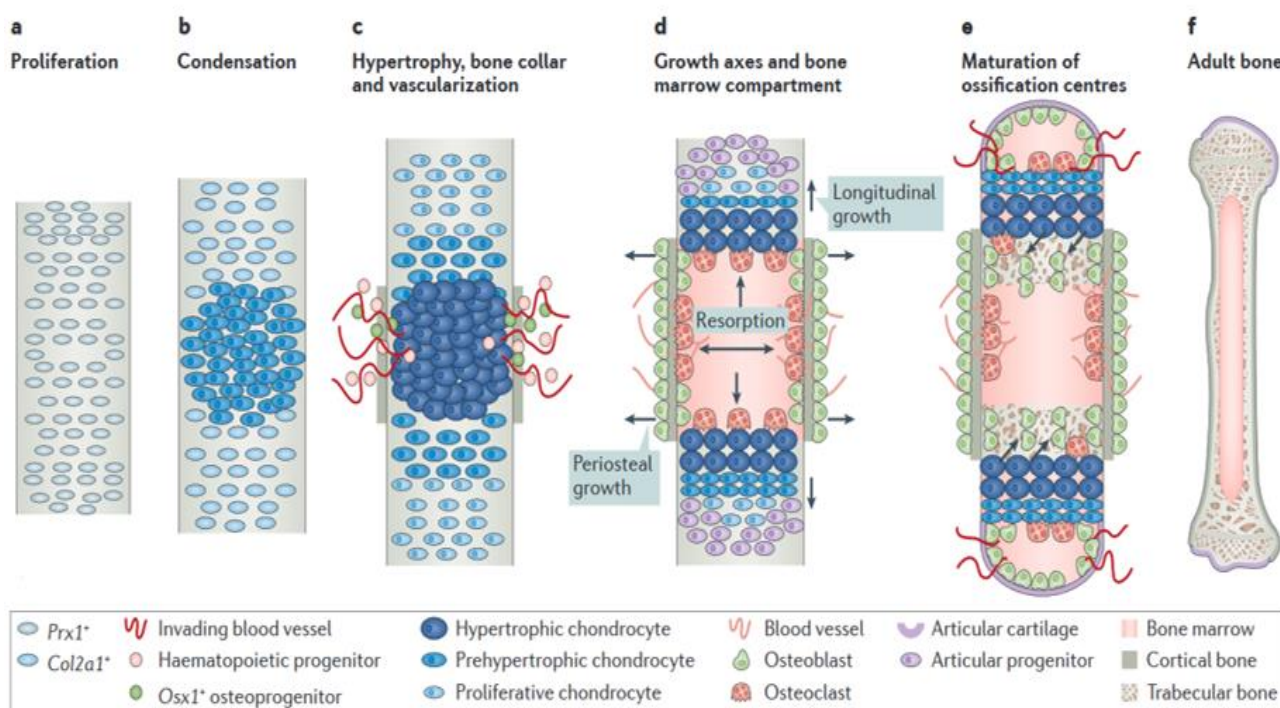


Figure 8 : Les différentes étapes de l'ossification endochondrale au niveau d'un os long. **(a)-** Prolifération des cellules souches mésenchymateuses. **(b)-** Condensation de ces cellules. **(c)-** Hypertrophie cellulaire et néovascularisation **(d)-** Formation du centre d'ossification primaire et croissance en longueur. **(e)-** Maturation et apparition du centre d'ossification secondaire au niveau de l'épiphyse. **(f)-** Construction de l'os adulte (Salazar et al., 2016).

Durant la **première phase**, les cellules **mésenchymateuses sont engagées pour devenir des cellules cartilagineuses**. Cet engagement est induit par des facteurs paracrines qui poussent les cellules mésodermiques voisines à exprimer deux facteurs de transcription, Pax1 (Paired box 1) et Scleraxis (Cserjesi et al., 1995 ; Šošić et al., 1997). Ces facteurs de transcription sont censés activer les gènes spécifiques du cartilage. Dans une **deuxième phase**, les cellules mésenchymateuses se **condensent en nodules** et se différencient en chondrocytes. Durant la **troisième phase** de cette ossification, le cartilage **s'élargit** à travers la prolifération des chondrocytes et la production de matrice extracellulaire spécifique riche en collagène de type II et agrécane. Pendant la quatrième phase, les chondrocytes du cartilage s'arrêtent de proliférer, s'agrandissent (**hypertrophie**) et modifient leur programme génétique pour synthétiser le **collagène de type X**. La chondrocyte hypertrophique, par changement de sa taille, est considéré comme le principal moteur de la croissance osseuse (Chung, 2004). Les cellules hypertrophiques, dirigent aussi la minéralisation de la matrice environnante et le processus d'ossification, via la production des facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFs) et d'autres facteurs, qui vont attirer les ostéoclastes (Olsen et al., 2017). Le rôle des cellules hypertrophiques ne se limite pas à ce stade, mais ces cellules dirigent également les cellules péri-chondrales adjacentes pour devenir des ostéoblastes afin de former le collier d'os (bone collar) tout autour du cartilage hyalin (Chung, 2004). Dans une **cinquième phase**, les chondrocytes hypertrophiques subissent ensuite la mort cellulaire apoptotique où ils se convertissent en ostéoblastes (Tsang et al., 2015). La matrice de cartilage laissée derrière fournit un échafaudage pour les ostéoblastes qui envahissent le reste du tissu cartilagineux avec les vaisseaux sanguins et établissent une véritable matrice osseuse à l'intérieur, phénomène appelé **ossification primaire**. Cette ossification se déroule lors de la mise en place de la diaphyse et de l'épiphyse, ainsi que pendant la phase de croissance au niveau du cartilage de conjugaison. De là, les cellules hypertrophiques jouent un rôle crucial et très marquant dans la coordination de la chondrogenèse et l'ostéogenèse des péri-chondres.

En même temps que les chondrocytes hypertrophiques effectuent ces multiples tâches au centre de la matrice cartilagineuse, cette dernière s'agrandit encore par la **prolifération continue** des chondrocytes. À mesure que l'os s'agrandit, la tige hématopoïétique interagit avec le stroma pour établir le site principal de l'hématopoïèse dans la vie post-natale.

À des degrés variables, et selon l'os concerné, une partie des chondrocytes prend une forme discoïde aplatie et forment des **colonnes** avec une **orientation** qui dirige le prolongement de l'os (Abad et al., 1999

; Kuss et al., 2014). La prolongation osseuse, particulièrement rapide au cours de la vie fœtale, est principalement due au taux de formation de chondrocytes hypertrophiques à partir des chondrocytes prolifératifs. Au fur et à mesure que l'os s'agrandit, des centres **d'ossification secondaires** sont établis à l'âge murin d'environ 5 à 7 jours de la vie postnatale, lorsque les chondrocytes situés dans des endroits caractéristiques cessent de proliférer et s'hypertrophient (Dao et al., 2012).

Dans les os longs des membres, les chondrocytes continuent à proliférer entre les régions de l'os des centres d'ossification primaire et secondaire. Elle est appelée **plaque de croissance**, car il forme une plaque distincte de cellules entre les centres d'ossification secondaire et primaire. Au sommet de la plaque de croissance, les chondrocytes sont ronds ne prolifèrent pas rapidement et sont appelés chondrocytes de repos ou de réserve. Ils servent de précurseurs pour les chondrocytes proliférants. Chez l'homme, les plaques de croissance disparaissent au moment de l'adolescence après une poussée d'activité pubertaire (Shim, 2015). Il existe des différences dans la physiologie des plaques de croissance entre les rongeurs et les humains (Benyi and Sävendahl, 2017). Chez les rats ou les souris, la poussée de croissance pubertaire est sans particularité et la croissance osseuse longitudinale continue même après la maturation sexuelle, car la fusion épiphysaire ne se produit pas au moment de la maturation sexuelle. Par conséquent, il existe des difficultés dans l'application directe des études sur les plaques de croissance des rongeurs sur les humains (Nilsson et al., 2005).

1.5.2.1 Différentes zones du cartilage de croissance

Les chondrocytes du cartilage de croissance sont disposés en zones morphologiquement distinctes dont l'expression génique diffère selon ces zones, reflétant ainsi les changements dans leur état fonctionnel (Figure 10).

Tout d'abord, **la zone de réserve** qui est la zone la plus éloignée de la région d'ossification primaire où les chondrocytes sont au repos (stem-like cells)

Ensuite, la zone adjacente à celle-ci est **la zone de prolifération**. Cette zone est caractérisée par des chondrocytes proliférants ronds qui au fur et à mesure, deviennent aplatis et seront emballés dans des amas multicellulaires ; les colonnes constituées de huit chondrocytes. Cette zone est caractérisée par l'expression de collagène de type II (Col2) et de l'agrécan (Acan) (Prein et al., 2016).

Après la prolifération, les chondrocytes passent par un stade de transition dans lequel ils sont connus sous le nom de chondrocytes **préhypertrophiques**.

Finalement, ces cellules subissent une **hypertrophie**, en augmentant considérablement leur volume, et en sécrétant en même temps la matrice extracellulaire riche en collagène de type X (Col10) (Prein et al., 2016), qui finit par se minéraliser ; la prolifération des chondrocytes et la sécrétion de la matrice provoquent l'allongement de l'os (Mackie et al., 2008).

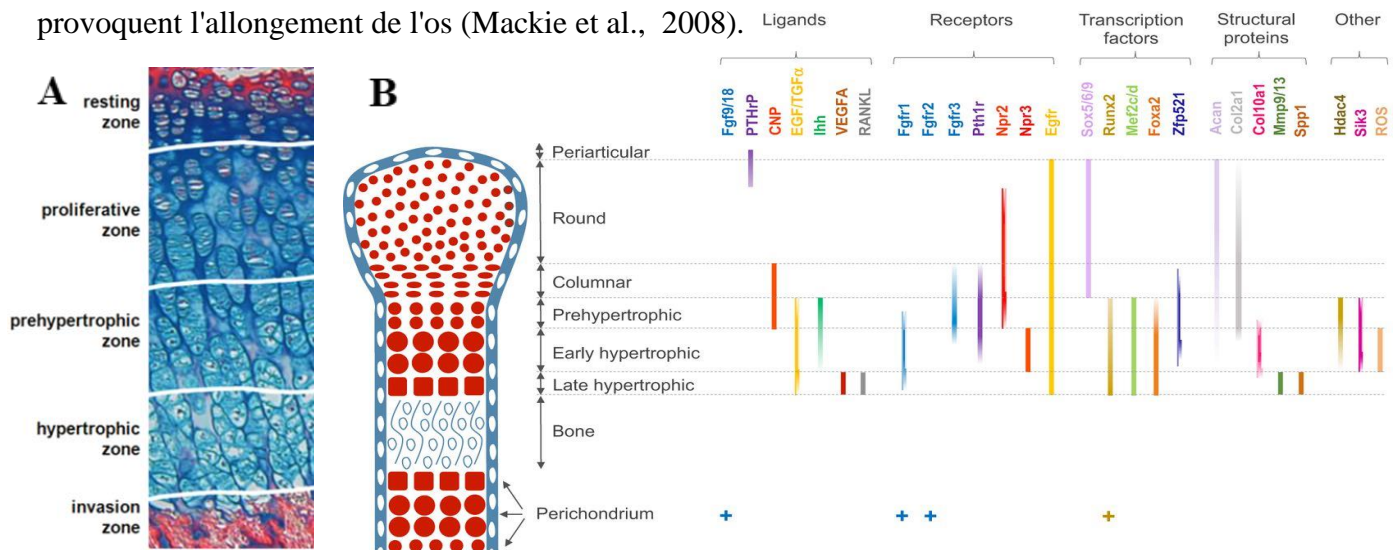


Figure 9 : Organisation du cartilage de croissance et ses différentes zones. *A- Organisation de la plaque de croissance de tibia de souris de 15 jours. Microphotographie d'une section colorée à l'hématoxyline / Bleu Alcian / Rouge Sirius. Différentes zones de plaques de croissance peuvent être distinguées en fonction de l'évolution de la morphologie et de la disposition des cellules (Dreier, 2010).* *B- Expression génétique spatiale de différents facteurs impliqués dans l'ossification endochondrale (Kozhemyakina et al., 2015).*

1.5.2.2 Etude structurale des chondrocytes

Les chondrocytes dans le cartilage de croissance sont généralement considérés comme une population uniforme, mais les études ultrastructurales ont démontré que deux types de cellules, '**claires**' et '**sombres**', peuvent être observées dans le cartilage de croissance (Wilsman et al., 1981). Les chondrocytes 'clairs' ont un réticulum endoplasmique moins développé et une région de Golgi discrète. Les chondrocytes 'sombres', en revanche, ont un réticulum endoplasmique bien développé et une zone de Golgi proéminente ; ils possèdent de nombreux processus cytoplasmiques, avec des vésicules bourgeonnant à la surface des cellules. Ces deux types de chondrocytes représentent deux populations post-prolifératives distinctes, avec une expression génétique différente (Ahmed et al., 2007).

1.5.2.3 Cytosquelette des chondrocytes

Le cytosquelette des chondrocytes est composé d'un réseau interconnecté de **microtubules**, **d'actine** et de **vimentine**. Le cytosquelette est essentiel au **maintien de la forme** et du **phénotype** chondrocytaire, ainsi que l'organisation de l'appareil de Golgi et le trafic intracellulaire (Benjamin et al., 1994).

Les chondrocytes, comme beaucoup de cellules eucaryotes, possèdent des **cils primaires**, qui sont des organelles constituées d'un corps basal et d'un axonème qui s'étend de plusieurs micromètres de la surface cellulaire (Poole et al., 1985). Ces cils interagissent avec de nombreuses composantes de la matrice extracellulaire et avec les composantes des microtubules de leur cytosquelette (Jensen et al., 2004). En 2004, des études réalisées par Jensen et al., montrent que ces cils agissent comme des mécano-capteurs impliqués dans la structuration, et la croissance du squelette. De plus, ces cils sont impliqués dans l'ossification endochondrale et le déclenchement de fonctions mécaniques du cartilage articulaire (Irianto et al., 2014). En effet, il a été montré que la déficience partielle en Tg737, gène codant aux protéines de polarisation des cils (McGlashan et al., 2007), et la déficience totale en Kif3a (Kinesin Family Member 3A), sous-unité responsable de la formation des cils, chez des modèles de souris, induisent des défauts d'ossification endochondrale et un nanisme chez les souris néonatales (Song et al., 2007).

1.5.2.4 Orientation des chondrocytes au sein de la plaque de croissance

Les organismes multicellulaires contrôlent leur morphogenèse en formant des **gradients de signalisation** pour coordonner la croissance et la structuration, dans lesquels l'établissement de la polarité dans une famille de cellules est essentiel (Wolpert, 1969). C'est ce qu'on appelle la polarité cellulaire planaire ou

PCP. Il se réfère, à l'origine, à la polarité des cellules épithéliales dans un plan orthogonal à leur axe apical-basal (Tree et al., 2002).

Dans la zone proliférative de la plaque de croissance, les chondrocytes sont disposés en colonnes de 6-8 cellules. En 1930, Dodds a noté que les chondrocytes, qui se divisent perpendiculairement à l'axe long de l'os en croissance, doivent subir des mouvements importants pour s'organiser en **colonnes longitudinales** (Dodds, 1930). Cette disposition peut être due à des propriétés physiques ou mécaniques de la matrice extracellulaire ou éventuellement à des molécules de signalisation. En 2003, il a été montré que **l'intégrine $\beta 1$** est impliquée dans la motilité et la prolifération des chondrocytes et que son absence affecte l'organisation colonnaire des chondrocytes (Aszodi et al., 2003). De plus, Li et Dudley ont montré en 2009, que la signalisation **non canonique de Frizzled (Fzd)** joue un rôle important dans la génération de la polarité et de l'arrangement cellulaires, ce qui entraîne des éléments squelettiques plus courts et plus larges chez les poussins ayant une inhibition de Fzd7 par comparaison aux sauvages (WT : Wild-type) (Li and Dudley, 2009). Une autre étude a suggéré que les cils primaires peuvent en partie être responsables des gradients de polarisation dans la plaque de croissance et permettent aux cellules prolifératives de s'aligner dans une orientation et une position spécifique (McGlashan et al., 2006 ; Moore and Jacobs, 2018). En 2011, Gao et al. ont montré que **ROR2** (Receptor Tyrosine Kinase Like Orphan Receptor 2) et **Vangl2** (Van Gogh-Like 2) forment un complexe de récepteur qui est induit par Wnt (Wingless) et qui est essentiel au processus de PCP et à l'organisation de la plaque de croissance (Gao et al., 2011).

1.5.2.5 Effets de certains facteurs sur l'ossification endochondrale

Comme tous les tissus de l'organisme, l'os est sous le contrôle et l'influence de nombreuses **hormones** et **facteurs**, pendant sa phase de croissance ainsi que pendant son remodelage. L'action de ces facteurs va surtout s'exercer sur le cartilage de croissance qui va déterminer par la suite, l'âge squelettique adulte.

1.5.2.5.1 Effets hormonaux

Les principales hormones systémiques qui régulent la croissance prénatale et postnatale comprennent l'hormone de croissance (**GH**), l'hormone thyroïdienne (**T₃**), les **glucocorticoïdes**, et les **stéroïdes sexuels** (Benyi and Sävendahl, 2017).

a) L'hormone de croissance (GH, ou somatotropine)

Cette hormone a été reconnue comme un régulateur important du développement squelettique. Son principal effet sur les chondrocytes dans le cartilage de croissance est de **stimuler leur prolifération**

(Oberbauer and Peng, 1995). Toutefois, la GH peut stimuler cette croissance à travers une action locale sur le cartilage de croissance qui semble être **dépendante** ou **indépendante** de la production locale d'**IGF-1** (Insulin-Like Growth Factor-1) (Wu et al., 2015). Il a été reporté que l'**augmentation** des niveaux de sécrétion de GH (Growth Hormone) due à l'adénome hypophysaire chez les enfants, cause le **gigantisme** (Rhee et al., 2014). Au contraire, la **déficience** en GH ou l'incapacité génétique de répondre à cette hormone peuvent entraîner à leur tour **des troubles de croissance** (Brod et al., 2017).

b) Les hormones stéroïdiennes

i. Les œstrogènes :

Au cours de la puberté, les œstrogènes induisent la **stimulation** de l'axe **GH-IGF-1** et **une poussée de croissance pubertaire** (Benyi and Sävendahl, 2017). Des preuves indirectes suggèrent que la fusion épiphysaire se produit lorsque la capacité proliférative des chondrocytes de la plaque de croissance est épuisée et que l'œstrogène agit en faisant progresser la sénescence de la plaque de croissance (Chagin and Sävendahl, 2007). En effet, Börjesson et al. ont étudié les mécanismes de la poussée pubertaire et de la fusion épiphysaire avec des souris invalidées pour le récepteur aux œstrogènes de sous-types $E\alpha$ (Estrogen Receptor) spécifiques du cartilage et ont suggéré que l'activation de l'axe GH-IGF-1 avec de faibles doses d'œstrogènes est importante pour la poussée pubertaire au début de la puberté, alors que de fortes doses d'œstrogène à ses récepteurs dans le cartilage de croissance sont essentielles à la fusion épiphysaire (Börjesson et al., 2012). De plus, l'œstrogène est connu pour **favoriser la formation osseuse** en stimulant l'ostéoblastogenèse et en inhibant l'apoptose des ostéoblastes matures (Khosla et al., 2012). Il est également connu dans **l'inhibition** de la production d'**ostéoclastes** (Nakamura et al., 2007).

ii. Les androgènes :

Les androgènes contribuent également à **la formation osseuse** et à la poussée de croissance pubertaire, par une interaction directe avec les chondrocytes de la plaque de croissance (Kang et al., 2016). En effet, il a été montré que la dihydrotestostérone pourrait **stimuler** la **prolifération** et la synthèse des **protéoglycanes** dans les chondrocytes de la plaque de croissance *in vitro* et que la testostérone pourrait stimuler la prolifération des chondrocytes avec augmentation de la production locale d'IGF-1, dans une étude sur des chondrocytes en culture primaire (Krohn et al., 2003).

c) Les hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes sont un autre **régulateur systémique** de **la croissance squelettique** (Shao et al., 2006). On sait depuis longtemps que l'hypothyroïdie infantile entraîne un arrêt réversible mais complet

de la croissance linéaire associée à un retard de l'âge osseux (Casado de Frías et al., 1993 ; Gutch et al., 2013). La résistance à l'hormone thyroïdienne (RTH) est provoquée par des mutations du récepteur de l'hormone thyroïdienne β caractérisé par un phénotype hétérogène associé à des taux élevés de T_4 (Thyroxine) et de T_3 (Triiodothyronine) libre et de TSH circulants et incluant certains patients présentant des épiphyses pointillées et un retard de croissance (Kopp et al., 1996 ; Rivas and Lado-Abeal, 2016). Cette étude était contradictoire avec une autre réalisée par Kaneshige et al. en 2001, qui a démontré que des mutations au niveau du gène du récepteur de l'hormone thyroïdienne- β chez les souris n'entraîne pas un déficit de croissance (Kaneshige et al., 2001). Le récepteur T_3 - α , à son tour, exerce un effet sur la croissance. C'est ainsi qu'une déficience en ce récepteur chez les souris génétiquement modifiées provoque un **arrêt de croissance** et une maturation osseuse avec **désorganisation** des chondrocytes de la plaque épiphysaire (Fraichard et al., 1997 ; Bochukova et al., 2012). De plus, l'effet de ces hormones sur les composants de la matrice extracellulaire du cartilage a été bien élucidé. En effet, il a été montré que l'hormone thyroïdienne T_3 stimule la production des protéoglycanes au niveau de la MEC (Bassett et al., 2006).

I.5.2.5.2 Effets des facteurs sécrétés

a) Les facteurs de croissance (IGF-I)

L'hormone de croissance (GH) et le facteur de croissance (IGF-1) sont les principaux stimulateurs de la croissance osseuse longitudinale. IGF-1 existe sous deux formes. La forme **circulante** (Liver-derived insulin-like growth factor-I), sécrétée par le foie, responsable d'une grande partie de l'effet de GH sur la croissance du squelette (Lindsey and Mohan, 2016). De plus, une réduction des taux circulants d'IGF-1 chez la souris entraîne une réduction de la croissance longitudinale (Yakar et al., 2002). La forme secondaire est l'IGF-1 **sécrété localement** par les chondrocytes. La croissance osseuse longitudinale est médiée par la GH, l'IGF-1 circulant, mais d'une façon plus importante par l'IGF-1 local dans la plaque de croissance. Ce dernier semble être important dans la **différenciation**, la **prolifération** et l'**hypertrophie** des chondrocytes ainsi que dans la production de la matrice extracellulaire et l'ossification (Giustina et al., 2008). Il a été montré que les souris déficientes en récepteur d'IGF-1 (IGF1R) présentent une hypoplasie, un retard de la calcification squelettique, un retard de croissance et des problèmes respiratoires (Liu et al., 1993 ; Kawai and Rosen, 2012). La GH et l'IGF-1 sont également importants pour l'acquisition de la masse osseuse pendant la période pré-pubertaire et le maintien de l'homéostasie osseuse tout au long de la vie (Courtland et al., 2011).

b) Les BMPs (Bone morphogenetic proteins)

Les BMPs, également appelées facteurs de croissance et de différenciation (GDFs), font partie de la famille des facteurs paracrines du TGF- β (Transforming Growth Factor- β) qui activent les récepteurs hétérodimériques (Feng and Derynck, 2005). Ils ont été découverts en raison de leur capacité remarquable à induire **la formation osseuse endochondrale** lorsqu'ils sont injectés par voie sous-cutanée chez la souris et en raison de leur voie de signalisation qui régule de multiples aspects du développement de la plaque de croissance en régulant la prolifération et la différenciation des chondrocytes par un gradient de signalisation dans la plaque de croissance ainsi que dans le cartilage articulaire (Garrison et al., 2017). Il a été démontré que les embryons de souris dépourvus à la fois *du Bmpr1a* et *du Bmpr1b* (les récepteurs de BMP) dans les cellules chondrogéniques n'arrivent pas à former de nombreux éléments cartilagineux et présentent des défauts marqués dans la prolifération, la survie et l'hypertrophie des chondrocytes ainsi qu'une chondrodysplasie générale (Yoon et al., 2006). Il a toujours été observé que la signalisation de la BMP **favorise** la prolifération des chondrocytes dans le cartilage de croissance (Minina et al. 2002). Les BMPs ont plusieurs rôles importants au cours des étapes ultérieures du développement du cartilage. C'est ainsi que le traitement des chondrocytes isolés avec la BMP6 ou l'expression des récepteurs des BMPs constitutivement conduit à une expression accrue du collagène de type X, suggérant que la signalisation de la BMP **induit une hypertrophie chondrocytaire** (Grimsrud et al., 2001). En outre, la signalisation de la BMP augmente l'expression de l'**Ihh** (Indian Hedgehog) produit par les chondrocytes préhypertrophiques, et peut donc augmenter à la fois la prolifération des chondrocytes et la longueur des colonnes des cellules en prolifération (Minina et al., 2001). De plus, il a été montré que les **BMPs** et les **FGFs** (Fibroblasts Growth Factors) ont des effets opposés sur la différenciation terminale des chondrocytes hypertrophiques et que en raison de cela, ces deux voies de signalisation peuvent être considérées comme **antagonistes** (Minina et al., 2002).

c) Les PTHrPs (Parathyroid hormone-related peptide)

PTHrP est un facteur **paracrine**, sécrété pendant la vie fœtale. Il est fortement exprimé par les cellules du **périchondre** périarticulaire et à un niveau moindre par les chondrocytes en prolifération près de la surface articulaire (Lee et al., 1995 ; Wysolmerski 2012). PTHrP agit via le même récepteur (PTH/PTHrP receptor, le PTHR1) utilisé par l'hormone parathyroïdienne. Ce récepteur est exprimé à des faibles niveaux par les chondrocytes prolifératifs mais à des niveaux élevés par les chondrocytes préhypertrophiques/hypertrophiques précoces (MacLean and Kronenberg, 2005). En limitant le passage

de la prolifération à l'hypertrophie, le PTHrP maintient les chondrocytes dans un état prolifératif, diminue le nombre de cellules capables d'exprimer l'Ihh, et participe ainsi à un rétrocontrôle négatif régulant sa propre expression et le taux de différenciation chondrocytaire (Lee et al., 1996 ; Mau et al., 2007) (Figure 10). L'inactivation ciblée du gène codant pour PTHrP ou son récepteur chez la souris entraîne un nanisme néonatal léthal, causé par une hypertrophie prématurée des chondrocytes (Karaplis et al., 1994 ; Guo et al., 2002), identifiant ainsi le rôle clé de la signalisation du PTH (Parathyroid Hormone) dans la suppression de l'hypertrophie chondrocytaire au niveau de la plaque de croissance. En termes de voie de signalisation, il a été suggéré que PTHrP retarde l'hypertrophie chondrocytaire en augmentant l'activité de Sox9, et/ou en inhibant l'expression de Runx2, qui stimule l'hypertrophie chondrocytaire (Guo et al., 2006 ; Guo et al., 2002). En ce qui concerne son effet sur le processus d'ossification, il a été montré que l'expression du PTHrP en cas de déficience en PTH favorise la formation osseuse et augmente le volume trabéculaire (Miao et al., 2004).

d) IHH (Indian hedgehog)

Indian hedgehog est un membre de la famille Hedgehog (HH) qui, chez les mammifères, comprend également Sonic Hedgehog (SHH) et Desert Hedgehog (DHH). Cette famille de protéines joue un rôle fondamental dans le développement chez les animaux et elle est conservée de la drosophile aux vertébrés (Huangfu and Anderson, 2006). Nous parlerons ici d'Ihh, un facteur exprimé par les chondrocytes préhypertrophiques, qui stimule la prolifération des chondrocytes et inhibe leur hypertrophie (St-Jacques et al., 1999 ; Deng et al., 2018). Ihh régule l'expression de PTHrP, la formation de chondrocytes colonnaires à partir de chondrocytes ronds dans la zone de prolifération et la différenciation ostéoblastique des cellules mésenchymateuses (Hilton et al., 2007). La voie de signalisation d'Ihh implique le facteur de transcription *Gli3*, dont la perte d'expression chez les souris invalidées pour le gène *Ihh* restaure la prolifération des chondrocytes, réactive l'expression de PTHrP et retarde la différenciation hypertrophique accélérée observée chez ces souris (Koziel et al., 2005). Il a été également démontré que les voies de signalisation de l'IGF-1 et d'IHH dans le cartilage de croissance fonctionnent indépendamment l'une de l'autre, et que la perturbation de leurs voies de signalisation entraîne une réduction additive de la croissance osseuse longitudinale (Fanxin Long et al., 2006). En ce qui concerne son rôle durant le développement postnatal, il a été montré que ce facteur est essentiel dans le maintien des chondrocytes de la plaque de croissance, du cartilage articulaire ainsi que dans le maintien des os trabéculaires et du développement squelettique (Maeda et al., 2007). En conclusion, le facteur Ihh semble être un régulateur principal de la différenciation chondrocytaire et ostéoblastique au cours de la formation osseuse endochondrale. Il

stimule la prolifération des chondrocytes directement ou par la stimulation de la synthèse de PTHrP (Figure 10).

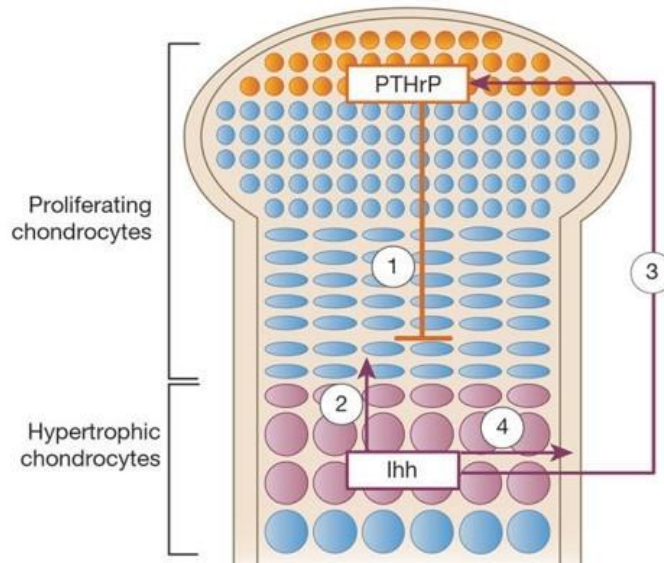


Figure 10 : Boucle de rétrocontrôle négative de Ihh/PTHrP. 1- Le PTHrP est sécrété par les cellules péri-chondriales et les chondrocytes aux extrémités des os longs. Le PTHrP agit sur les récepteurs des chondrocytes en prolifération pour maintenir la prolifération des chondrocytes et retarder ainsi la production d'Ihh. 2- Lorsque la source de production de PTHrP est suffisamment distante, alors Ihh est produit. L'Ihh agit sur son récepteur sur les chondrocytes pour augmenter le taux de prolifération 3- Ihh stimule la production de PTHrP aux extrémités des os. 4- Ihh agit également sur les cellules péri-chondriales pour convertir ces cellules en ostéoblastes (Kronenberg, 2003).

e) La famille des Wnts (Wingless integration site)

Les voies de signalisation Wnt sont un groupe de voies de transduction de signal constituées de protéines qui transmettent des signaux dans une cellule à travers des récepteurs membranaires. Trois voies de signalisation Wnt ont été caractérisées : la **voie canonique** où les protéines Wnts se lient à leur récepteurs Fzd et leur co-récepteur (LRP5 ou LRP6 : Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5 ou 6) ; la voie de la **polarité des cellules planaires** non canoniques ; où les protéines Wnts se lient à leur récepteur vangl et à leur co-récepteur (ROR2, ou PC1), et à la voie **Wnt/calcium** non canonique où les protéines Wnts se lient à leur récepteurs Fzd seul. Un certain nombre de membres de la famille Wnt qui sont capables d'activer à la fois les voies canoniques et non canoniques sont exprimés dans le cartilage de croissance. Les niveaux d'expression sont plus élevés dans les zones prolifératives et hypertrophiques (Andrade et al., 2007). Tamamura et al. avaient démontré que l'activation constitutive de la voie β -caténine dans les chondrocytes immatures supprime l'hypertrophie, mais favorise la différenciation terminale dans les chondrocytes plus matures (Tamamura et al., 2005). La signalisation Wnt dans la survie des chondrocytes semble se produire en aval d'Ihh dans la zone de prolifération précoce, mais indépendamment d'Ihh dans la zone proliférative ultérieure (Mak et al., 2006). A titre d'exemple Wnt5a et Wnt5b sont exprimés par les chondrocytes lors de la transition de la zone proliférative à la zone hypertrophique chez la souris. Les souris Wnt5a *-/-* ont montré un retard marqué dans **l'hypertrophie** des chondrocytes (Yang et al., 2003). De plus, Gao et al. ont montré que le gradient de signalisation de Wnt fournit des informations sur la direction des cellules (Gao et al., 2011). C'est ainsi qu'il a été montré que le Wnt5a joue un rôle instructif dans le contrôle de la polarité cellulaire par l'intermédiaire de ROR2/Vangl2 selon sa concentration (Gao et al., 2011). Le tableau 2 représente les effets des membres de la famille de Wnts sur la différenciation des chondrocytes et leur hypertrophie.

Wnt	Differentiation	Hypertrophy
Wnt1	Inhibits	-----
Wnt3a	Stimulates	Inhibits
Wnt4	Inhibits	Stimulates
Wnt5a	Stimulates	Inhibits
Wnt5b	Stimulates	Inhibits
Wnt8	Inhibits	Stimulates
Wnt7a	Inhibits	-----
Wnt9a	Inhibits	Stimulates
Wnt11	No effects	No effects

Tableau 2 : Effets de la voie de signalisation des Wnts sur la différenciation des chondrocytes et leurs hypertrophies (Green et al., 2015).

f) Les facteurs de croissance des fibroblastes (FGFs)

Les FGFs appelés facteurs de croissance des fibroblastes comprennent 18 protéines qui se lient aux récepteurs FGFRs (Ornitz and Itoh, 2015). 15 FGFs canoniques sont exprimés de manière différentielle dans la plupart des tissus de l'embryon en développement, où ils jouent le rôle de régulateurs essentiels du stade le plus précoce du développement et de l'organogenèse. Ces FGFs sont également exprimés dans les tissus postnatals où ils régulent la croissance et la fonction des chondrocytes. L'activité biologique des FGFs canoniques est renforcée par les héparanes sulfates (HS) et d'autres polysaccharides sulfatés (Ornitz and Itoh, 2015). Les FGFs, les FGFRs et leur co-récepteur sont exprimés de manière spatiotemporelle à tous les stades du développement du squelette (Figure 11). A titre d'exemple, les chondrocytes de la plaque de croissance expriment de très faibles taux de FGFR2 dans la zone de repos, des taux élevés de FGFR3 dans la zone de prolifération et pré-hypertrophique, et des taux élevés de FGFR1 dans les chondrocytes hypertrophiques (Lazarus et al., 2007). En outre, il a été montré que l'activation de FGFR3, conduit à une inhibition de la prolifération des chondrocytes et à une accélération de l'hypertrophie (Deng et al., 1996 ; Colvin et al., 1996 ; Ornitz and Marie, 2015). Ce facteur présente une activité paradoxale entre les souris embryonnaires et postnatales. C'est ainsi qu'il favorise la chondrogenèse chez les embryons, alors qu'il inhibe la chondrogenèse chez les souris postnatales (Deng et al., 1996 ; Havens et al., 2008). Des mutations gain de fonction de FGFR3 provoquent le nanisme au cours de la croissance squelettique prépubertaire (Naski et al., 1996 ; Su et al., 2010), contrairement à la mutation perte de fonction qui provoque le gigantisme (Ornitz and Itoh, 2001 ; Ornitz and Marie, 2002). Trois mécanismes sont susceptibles de réguler le FGFR3 : les hormones thyroïdiennes, les hormones PTHrPs et l'hypoxie (Ornitz and Marie, 2015).

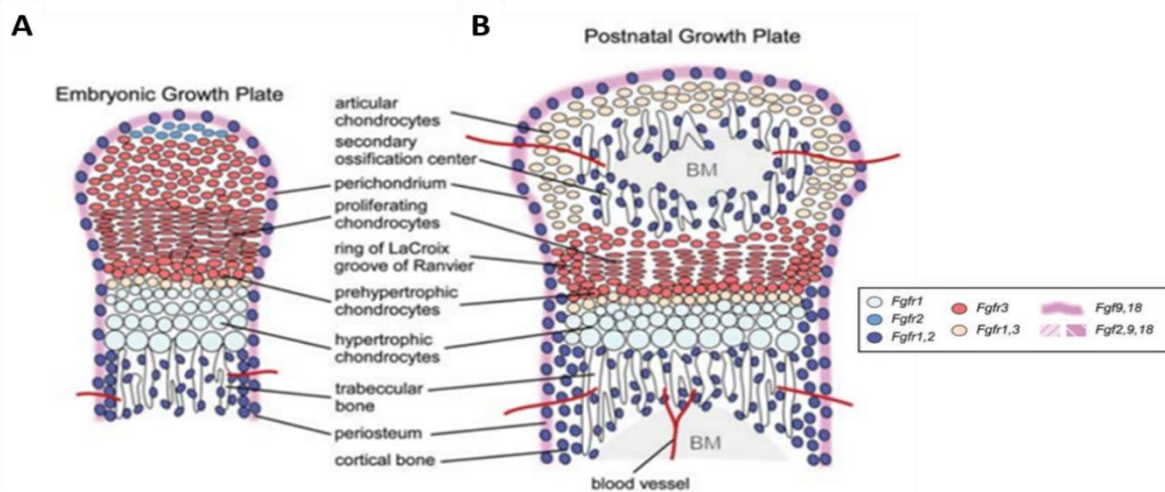


Figure 11 : Expression des facteurs de croissance du fibroblaste (FGFs) et de leur récepteurs (FGFRs) pendant le développement de l'os endochondral. A- Plaque de croissance embryonnaire. B- Plaque de croissance postnatale après formation du centre d'ossification secondaire. (BM) moelle osseuse (Ornitz and Marie, 2015).

I.5.2.5.3 Les stimulations biomécaniques

Non seulement les facteurs déjà évoqués régulent le mécanisme d'ossification endochondrale, la stimulation mécanique joue aussi un rôle essentiel dans le développement et le maintien du squelette. Un certain nombre d'expériences simulant les conditions *in vivo* de croissance et de fonction ont été développées au cours des années afin d'étudier le mode de fonctionnement des forces mécaniques dans les différents stades de la chondrogenèse. C'est ainsi que des études de l'effet de la stimulation mécanique *in vitro* ont démontré l'implication d'une protéine PC1 qui agit comme une molécule mécanosensible principale dans les cellules de type ostéoblaste primaire où elle induit l'expression de Runx2 (Gargalionis et al., 2017). De plus, des études *in vivo* sur le cartilage condylien de souris montrent que les différentes conditions de charge mécanique modulent les phénomènes de différenciation/maturation en affectant les niveaux d'expression de certains facteurs déterminants dans la chondrogenèse : Sox9, VEGF et FGFR3 (Papadopoulou et al., 2007). Des études sur des embryons paralysés de poussins et de souris ont révélé que divers éléments squelettiques cartilagineux étaient plus courts, que les éminences osseuses étaient significativement plus petites et que la taille de la zone proliférative dans les plaques de croissance des os longs était réduite par rapport aux embryons témoins (Nowlan et al., 2010 ; Roddy et al., 2011). En plus, il a été montré que la force mécanique est un régulateur clé de l'intercalation des chondrocytes dans le développement crâniofacial des poissons Zèbres, alors que chez les souris, elle contribue à l'élongation des colonnes de chondrocytes (Figure 12) (Shwartz et al., 2012).

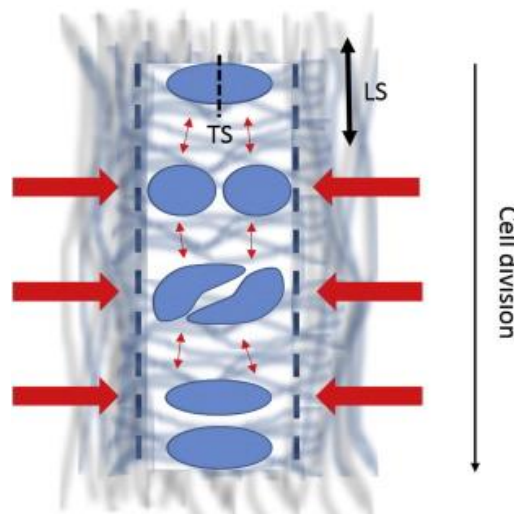


Figure 12 : Modèle d'organisation en colonne des chondrocytes de la plaque de croissance due aux différentes résistances mécaniques de la MEC. LS- Longitudinal septum ; TS- Transverse septum. (Prein et al., 2016).

I.5.3 Le remodelage osseux

Le remodelage osseux est un processus hautement complexe par lequel l'ancienne structure osseuse est remplacée par une nouvelle ce qui permet au tissu osseux de s'adapter aux contraintes mécaniques, de réparer les dommages structuraux qu'il subit, et de subvenir aux demandes internes de l'organisme (Calcium, Phosphate) (Figure 13). Contrairement au modelage, qui implique la résorption ou la formation d'os dans une région spécifique, le remodelage osseux suit toujours trois phases essentielles et séquentielles : l'activation, la résorption et la formation qui sont contrôlées à différents niveaux au cours de la succession des événements allant de la prolifération des cellules souches à la différenciation des cellules mûres (Robling et al., 2006).

La première phase d'activation est en partie régulé par les ostéocytes, qui détectent le stress mécanique et répondent à des stimulations biochimiques. Cette activation se traduit par une rétraction des cellules bordantes vers la surface endostéale et une digestion par les métalloprotéinases matricielles de la membrane endostée (Rucci, 2008). La présence dans cette phase de progéniteurs ostéoblastiques qui expriment RANKL est essentielle pour la différenciation des précurseurs ostéoclastiques.

Durant la deuxième phase de résorption, les ostéoclastes seront recrutés, suivis de la fusion de ces cellules activées pour devenir des ostéoclastes multinucléés. Ces cellules démarrent la résorption de l'os sous-jacent (Rucci, 2008). La résorption se fait en deux étapes successives, d'abord la dégradation de la fraction minérale par acidification, puis celle de la fraction organique sous l'action d'enzymes protéolytiques lysosomiales. La résorption de la matière organique apparaît sous forme de lacune de Howship.

Par la suite, la troisième phase de formation sera caractérisée par le recrutement des ostéoblastes dans la cavité de résorption et le dépôt d'un nouvel ostéoïde, qui est calcifié ultérieurement (Raggatt and Partridge, 2010).

Ce processus se produit sous l'action coordonnée des ostéoclastes, des ostéoblastes, des ostéocytes et des cellules bordantes osseuses qui forment ensemble la structure anatomique temporaire appelée unité multicellulaire de base (BMU) (Andersen et al., 2009) et sous la dépendance de plusieurs facteurs locaux et systémiques ; la vitamine D, le PTH et les hormones stéroïdiennes qui régulent ainsi la sécrétion de la matrice osseuse. Par exemple, une résorption excessive par les ostéoclastes sans le dépôt d'une nouvelle quantité osseuse correspondante, contribue à la perte osseuse et à l'ostéoporose (Sobacchi et al., 2013).

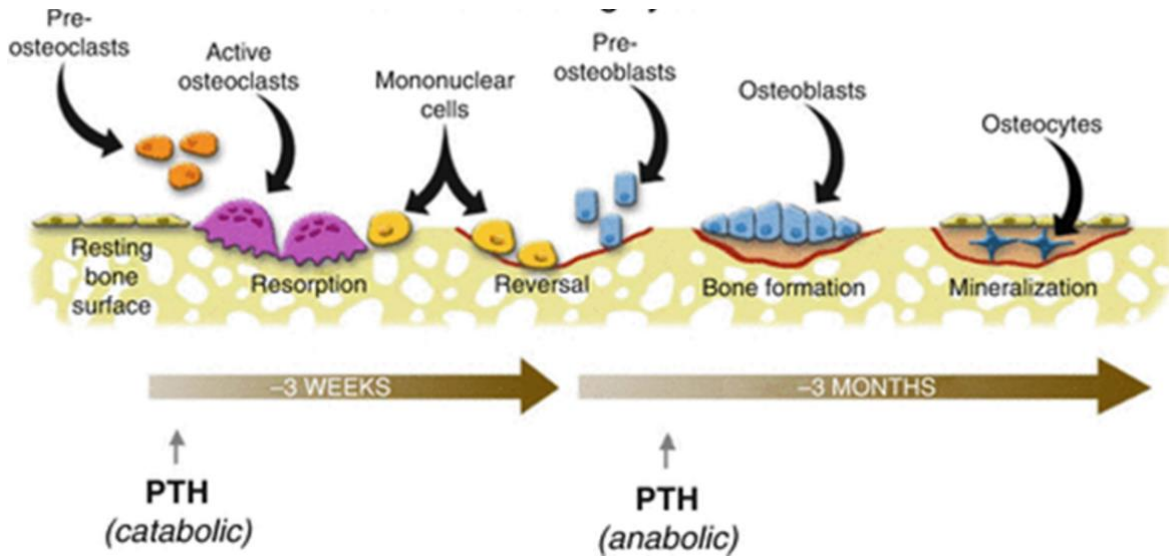


Figure 13 : Le remodelage osseux est contrôlé par le cycle de remodelage osseux
 (<https://musculoskeletalkey.com/osteonecrosis-and-metabolic-bone-disorders/>).

La matrice cartilagineuse et osseuse

II. La MEC cartilagineuse et osseuse

II.1 Les différentes régions de la MEC cartilagineuse

Le cartilage est particulièrement riche en matrice extracellulaire, représentant **90%** du poids du tissu sec, sécrétée par les chondrocytes. Cette matrice est constituée principalement d'eau (65-80%), de collagènes (15-22%), de protéoglycanes (4-7%), d'acide hyaluronique et en quantité moins importante de protéines non-collagéniques et de lipides (Patterson-kane and Firth, 2014). Le **collagène de type II** et l'**agrécan** constituent les composants majeurs du poids sec du cartilage. Elle est divisée en trois parties essentielles :

La matrice péricellulaire (MPC) : c'est une couche fine spécialisée de la MEC qui entoure immédiatement les chondrocytes. Elle est considérée comme le **microenvironnement** des chondrocytes. Elle se distingue du reste de la matrice, car elle canalise la communication entre les chondrocytes et la MEC. Elle est étudiée sous sa forme de **chondron**, constitué du chondrocyte et de sa matrice environnante (Patterson-kane and Firth, 2014 ; Zhang, 2015). En plus du collagène de type II et des protéoglycanes, le collagène de type VI est un élément structurel majeur du MPC. Le **collagène de type VI**, le **biglycan**, la **décorine** et la **matriline** sont considérés comme bloc de construction de la MPC (Zhang, 2015). Elle est également considérée comme **un champ de régulation** des facteurs de croissance, où ils sont activés, dégradés ou transportés (Macri et al., 2007).

La matrice territoriale : elle entoure la matrice péricellulaire. Elle est composée principalement de fines **fibrilles de collagène**, formant un réseau en forme de panier autour des cellules (Bhosale and Richardson, 2008). Cette région est **plus épaisse** que la matrice péricellulaire, et il a été proposé que la matrice territoriale pourrait **protéger** les cellules cartilagineuses contre les contraintes mécaniques. Elle peut entourer un chondrocyte tout seul ou un groupe de chondrocytes (Bhosale and Richardson, 2008).

La matrice interterritoriale : c'est la **plus grande** des trois régions matricielles et elle est caractérisée par les **faisceaux orientés** de fibrilles de collagène de grande taille, disposés parallèlement à la surface de la zone superficielle. Les protéoglycanes y sont abondants (Sophia Fox et al., 2009).

II.1.1 Les protéoglycanes (PGs)

Les PGs sont une famille de **macromolécules complexes** constituées d'une protéine « **core** » dont le poids moléculaire varie entre 10 KDa et > 500 KDa, et sur laquelle viennent se fixer des chaînes de **glycosaminoglycanes** (GAGs) chargées **négativement**. Dotés d'une position importante dans les matrices extracellulaires et au niveau de la surface cellulaire, ils sont impliqués dans une large gamme de processus biologiques en tant qu'**organismes moléculaires de la MEC** et **d'adhésion cellulaire** (Figure 14) (Morgan et al., 2007 ; Couchman and Pataki, 2012). Ils contrôlent la biodisponibilité de nombreux médiateurs solubles (Neill et al., 2015). Contrairement aux GAGs qui sont classés selon la répétition des unités disaccharidiques, la classification des PGs paraît être plus complexe. En 2015, Iozzo et al. ont proposé une classification basée sur trois critères essentielles : la localisation cellulaire, l'homologie gène/protéine et la présence de modules protéiques spécifiques dans leurs protéines cores (Figure 15). Ce qui rend les PGs très divers c'est qu'il existe environ **34 gènes différents** ainsi que des **éditions alternatives** qui enrichissent de plus en plus cette grande famille (Iozzo and Schaefer, 2015).

Les PGs existent au sein de **toutes les MEC** des tissus conjonctifs où ils assurent l'homéostasie tissulaire.

Les PGs représentent **le deuxième groupe** le plus large des macromolécules de la MEC cartilagineuse et constituent environ 10 à 15% du son poids sec (Sophia Fox et al., 2009).

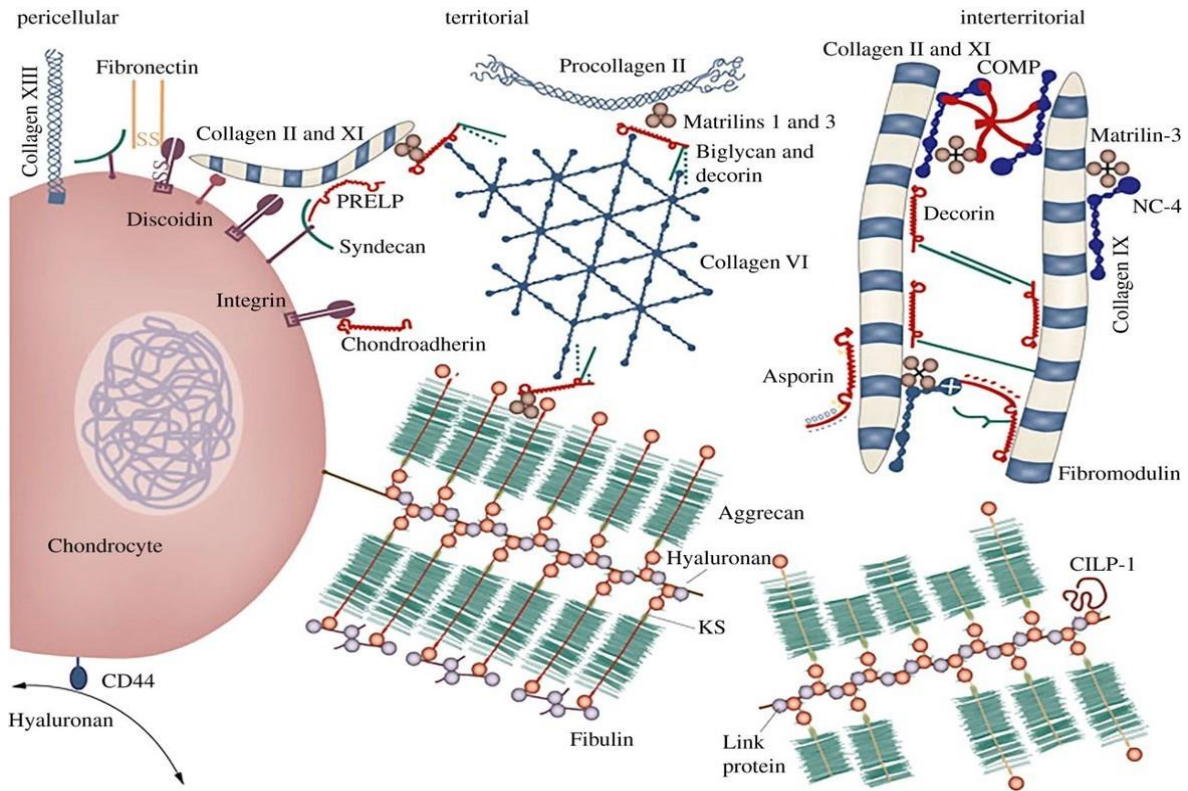


Figure 14 : Illustration schématique des constituants moléculaires du cartilage et de leur disposition en grands assemblages multimoléculaires. Les différentes compositions et organisations des constituants matricielles et leurs interactions avec un certain nombre de récepteurs et entre eux (Heinegård and Saxne, 2011).

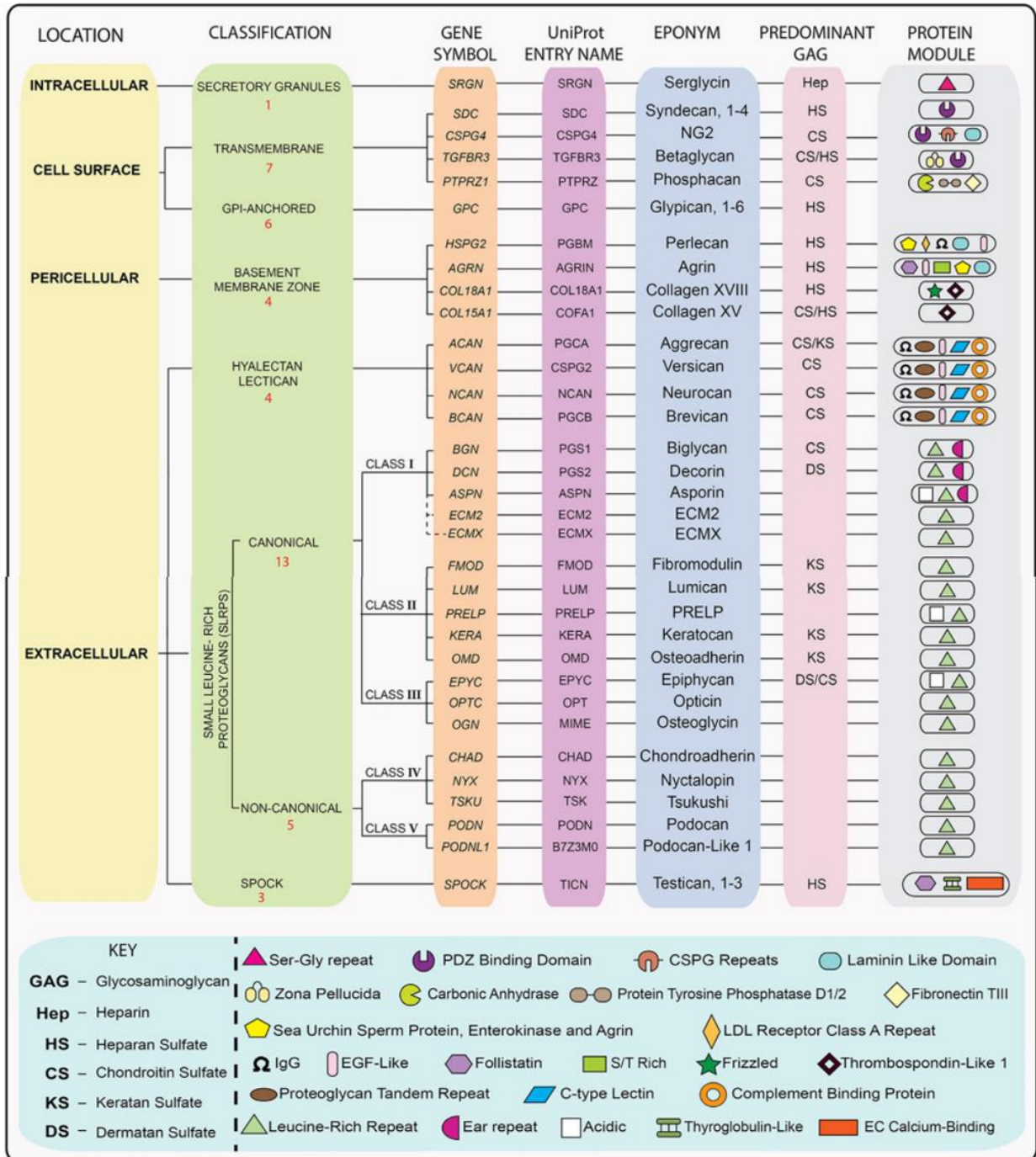


Figure 15 : Classification des PGs. Les PG sont classés en fonction de la localisation cellulaire et subcellulaire et de l'homologie aux niveaux protéique et génomique. Les légendes sont indiquées dans le panneau inférieur (Iozzo and Schaefer, 2015).

II.1.1.1 Les glycosaminoglycanes (GAGs)

Les GAGs sont de **longues chaînes polysaccharidiques**, non ramifiées, polyanioniques en raison de la présence des résidus de sucres acides et/ou des modifications par les groupements **sulfates**. Ils adoptent une conformation étendue, attirent des cations et pouvant lier des molécules d'eau. Ces chaînes sont composées d'unités disaccharidiques répétées, un sucre aminé (N-acétylglucosamine ou N-acétylgalactosamine) et un acide uronique (glucuronique ou iduronique) qui peuvent être sulfatés ou non sur différentes positions (tableau 3). La sulfatation particulière des chaînes de GAGs permet les **interactions**, normalement de nature ionique, avec **des facteurs de croissance** (Prydz and Dalen, 2000).

Il existe deux groupes essentiels de GAGs : ceux **sulfatés**, parmi lesquels les chondroïtines sulfates (CS), les dermatanes sulfates (DS), les héparanes sulfates (HS), les héparines (Hep) et les kératanes sulfates (KS) et le deuxième groupe **non sulfaté**, dont l'acide hyaluronique (HA) (tableau 3). Les drosophiles et *C. elegans* synthétisent les chaînes de GAGs, alors que les levures ne les synthétisent pas.

L'acide hyaluronique est un GAG **dépourvu de protéine core**. Il est formé au niveau de la membrane plasmique de la plupart des cellules par une enzyme appelée « hyaluronan synthase (Has) ». La Has2 est l'enzyme prédominante dans le cartilage (Hiscock et al., 2000). La synthèse d'acide hyaluronique se fait au niveau de la **membrane plasmique**, ensuite la chaîne en cours de croissance sera exportée directement dans l'environnement extracellulaire où elle forme une sorte de manteau tout autour des chondrocytes (Viola et al., 2008 ; Sze et al., 2016).

Les GAGs, à l'exception de l'acide hyaluronique sont liés à la protéine « core » par des **liaisons covalentes** via des résidus sérines (ou asparagine dans le cas des KS). La biosynthèse des GAGs nécessite la présence de plusieurs éléments constitutifs : les monosaccharides et les sulfates. Les sucres et les sulfates sont activés pour former des UDP-sucres et du 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate (PAPS), respectivement. Des transporteurs spécifiques transfèrent ensuite les UDP-sucres et le PAPS dans le RE et la lumière de l'appareil de Golgi (Prydz and Dalen, 2000). A l'exception des KS, l'étape initiale de la synthèse des GAGs est la formation de l'**amorce tétrasaccharidique** par l'addition séquentielle de **quatre monosaccharides** xylose, galactose, galactose et acide glucuronique. Ce processus est initié par les **xylosyltransférases I et II** (XT-I et XT-II), en catalysant le transfert d'un résidu xylose à partir de l'UDP-D-xylose sur un résidu sérine spécifique de la protéine « core ». Il s'ensuit l'addition du premier galactose par la β 1,4-galactosyltransférase I (GalT-I) et du deuxième galactose par la β 1,3-galactosyltransférase II (GalT-II) et enfin l'addition de l'acide glucuronique par la β 1,3-glucuronyltransférase I (GlcAT-I). A

partir de cette amorce tétrasaccharidique, les chaînes de GAGs sont prolongées par addition d'un sucre aminé et du GlcA.

Ces chaînes sont modifiées par le transfert de groupements sulfates sur des positions spécifiques par les sulfotransférases. Bien que la lumière de l'appareil de Golgi soit le site principal de synthèse des GAGs, la formation du précurseur tétrasaccharidique pourrait commencer plutôt dans la voie de sécrétion. La figure 16 illustre les différentes étapes de synthèse des chaînes de GAGs.

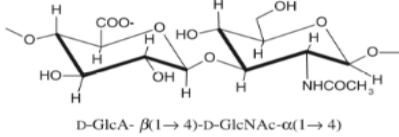
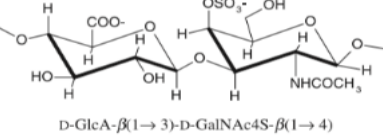
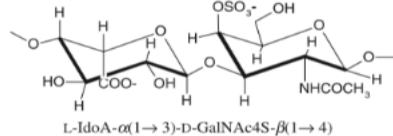
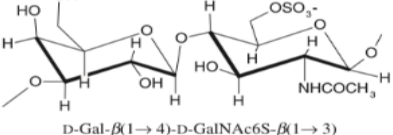
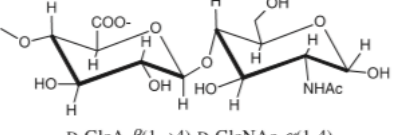
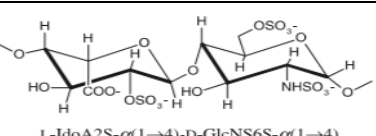
Glycosaminoglycans	Disaccharide units	Features
Hyaluronic acid (HA)	 <p>D-GlcA-β(1→4)-D-GlcNAc-α(1→4)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Molecular weight 4-8000 KDa ❖ Non-sulphated non-covalently attached to proteins in the ECM, also found in bacteria ❖ Usually found in synovial fluid, vitreous humour, ECM of loose connective tissue ❖ Excellent lubrication and shock absorbers
Chondroitin sulfate (CS)	 <p>D-GlcA-β(1→3)-D-GalNAc4S-β(1→4)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Molecular weight 5-50 KDa ❖ Most abundant GAG in the body ❖ Found in cartilage, tendon, ligament, aorta ❖ Bind to proteins (like collagen) to form proteoglycan aggregates
Dermatan sulfate (DS)	 <p>L-IdoA-α(1→3)-D-GalNAc4S-β(1→4)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Molecular weight 15-40 KDa ❖ Found in skin, blood vessels, heart valves
Keratan sulfate I and II	 <p>D-Gal-β(1→4)-D-GalNAc6S-β(1→3)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Molecular weight 4-19 KDa ❖ Most heterogenous ❖ KS I is found in the cornea ❖ KS II is found in cartilage aggregated with CS
Heparan sulfate	 <p>D-GlcA-β(1→4)-D-GlcNAc-α(1→4)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Molecular weight 10-70 KDa ❖ Extracellular component found in the basement membrane and as a ubiquitous component of cell surfaces
Heparin	 <p>L-IdoA2S-α(1→4)-D-GlcNS6S-α(1→4)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Molecular weight 10-12 KDa ❖ Intracellular component of mast cells, especially in the liver, lungs and skin

Tableau 3 : Tableau représentant les différents groupes de GAGs, leurs unités disaccharidiques et leurs caractéristiques (Gandhi and Mancera, 2008).

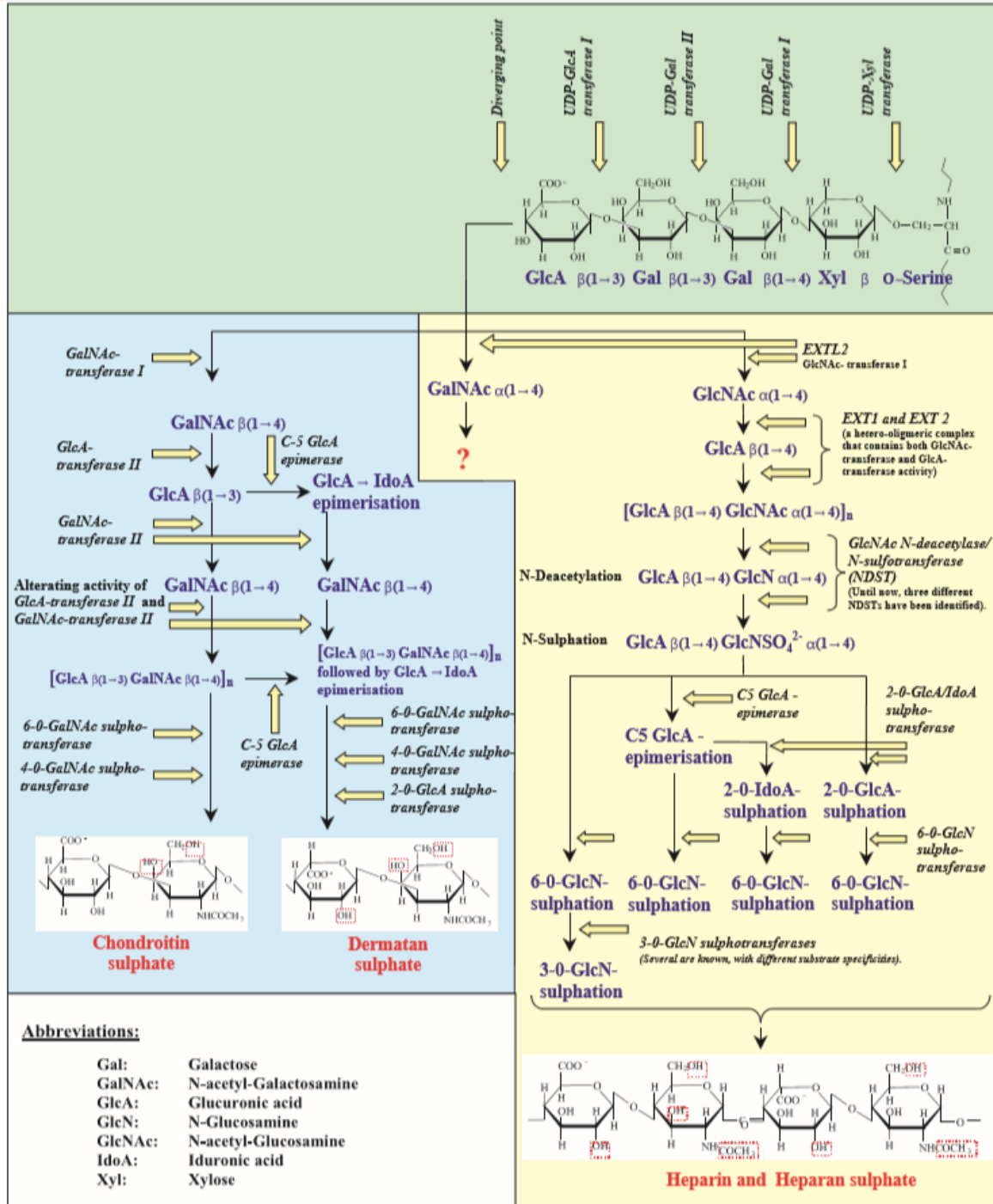


Figure 16 : Différentes étapes de synthèse des GAGs (CS, HS, DS et heparine) (Prydz and Dalen, 2000).

II.1.1.2 Les différentes familles de PGs

II.1.1.2.1 La famille des agrécane

Cette famille de PGs réfère aux PGs agrégés qui forment un **complexe large** et **multimoléculaire** avec les acides hyaluroniques (HA) (Watanabe et al., 1997 ; Roughley and Mort, 2014). Elle comporte : l'agrécane, la versicane, le neurocane et le brevicane. Parmi ces quatre PGs, l'agrécane reçoit plus d'attention puisqu'il est le **plus abondant** au niveau de la MEC cartilagineuse et le plus volumineux. Le versicane est exprimé dans la MEC mais en taux beaucoup plus faible que l'agrécane. Il est exprimé à un niveau élevé durant la condensation mésenchymateuse et disparaît rapidement au cours du développement du cartilage (Matsumoto et al., 2006).

II.1.1.2.1.1 L'agrécane

C'est un PG, composé d'une protéine core de poids moléculaire d'environ 230 KDa, sur laquelle viennent s'attacher environ 100 chaînes de GAGs à condroitine sulfate (**CS**), 50 à Kérotane sulfate (**KS**) et 50 chaînes d'**oligosaccharides** (Kiani et al., 2002). Le gène codant sa protéine core est localisée sur le chromosome 15 (15q26) (Hauer et al., 2017).

La figure 17 illustre la structure d'une molécule d'agrécane. La protéine core de l'agrécane est constituée de **trois régions globulaires** (G1, G2 et G3) avec des **régions étendues intermédiaires**. Du côté N-terminal, se situe la région G1 qui est séparée de la région G2 par un domaine interglobulaire (IGD). Ce domaine est un site proéminent pour l'action des protéinases ce qui facilite le clivage entre G1 et G2 (Fosang et al., 1992 ; Roughley and Mort, 2014). Les deux régions G1 et G2 sont séparées par une longue région d'acides aminés où les chaînes de GAGs KS et CS seront attachées. Le domaine riche en KS est celui adjacent au domaine G2 et il est suivi par deux domaines riches en CS (CS1 et CS2). Ces deux régions possèdent une susceptibilité différente à la protéolyse. Une molécule d'agrécane typique peut contenir plus de **100 chaînes de CS** et un nombre réduit de KS (Roughley and Mort, 2014). Le domaine CS2 est suivi par la dernière région **globulaire G3** du côté C-terminal de la protéine core. Cette région est composée de deux domaines où des facteurs de croissance épidermiques peuvent se fixer (EGF-like domain). De plus, cette région semble être essentielle pour le **trafic normal** de l'agrécane dans le chondrocyte et pour sa sécrétion dans la matrice extracellulaire (Zheng et al., 1998 ; Roughley and Mort, 2014). Tandis que l'organisation de l'agrécane est conservée parmi les différentes espèces, il existe des variations dans la structure de protéine core entre eux (Roughley and Mort, 2014).

L'agrécan n'est pas isolé dans la MEC, mais existe sous forme d'**agrégats**. Chaque agrégat est composé d'un filament central de HA, sur lequel viennent se fixer plus de 1000 molécules d'agrécanes (Watanabe et al., 1998). L'interaction entre HA et les molécules d'agrécan est assurée par la région G1 et sera stabilisée par la protéine de liaison appelée link protein (LP). Au niveau du cartilage, l'agrécan, par sa charge négative importante ainsi que sa grande taille semble être un **élément structurel important** (Kiani et al., 2002).

Il se trouve **piégé** par les fibres de collagène, qui lors de leur compression et de leur relaxation, facilitent l'entrée et la sortie de molécules d'eau au niveau du tissu, rôle important dans la résistance aux charges de compression ainsi qu'il protège les molécules du collagène du clivage protéolytique (Pratta et al., 2003).

La dégradation de l'agrécan et des agrégats peut s'effectuer selon trois processus différents : **enzymatique** où plusieurs protéases sont impliquées dans la dégradation de la protéine core, notamment les deux familles de métalloprotéases (MMPs et ADAMTS), **non-enzymatique** via une glycation et par l'intermédiaire des **hyaluronidases** et des **radicaux libres** (Roughley and Mort, 2014).

De plus, son contenu et sa composition semblent être en grande partie **liés à l'état des tissus**. Par exemple, dans le cartilage âgé, une diminution de la quantité absolue d'agrécan est observée, avec une diminution de la teneur en CS et une augmentation de la teneur en KS et de leur taille (Vynios, 2014).

C'est ainsi qu'une perturbation de synthèse ou une altération de la fonction de cette macromolécule pourrait affecter la **fonctionnalité du cartilage** articulaire et de l'articulation. C'est le cas de l'arthrose (OA), une maladie touchant le cartilage articulaire. Elle est due à la présence de nombreuses cytokines qui stimulent non seulement la production des protéases mais aussi la baisse de l'expression de l'agrécan (Roughley and Mort, 2014). Le rôle de l'agrécan dans **le développement squelettique** a été étudié par Domowicz et al. en 2009 sur des modèles de souris. Cette étude a pu montrer que l'absence d'agrécan entraîne une altération des voies de signalisation Ihh, FGF et BMP ce qui induit une maturation précoce des chondrocytes au niveau de la plaque de croissance conduisant ainsi à une anomalie de croissance des os longs (Domowicz et al., 2009). De plus, un dépistage génétique chez des patients souffrant de nanisme a permis d'identifier des mutations hétérozygotes au niveau du gène de l'agrécan, une cause fréquente du nanisme idiopathique héréditaire (Hauer et al., 2017).

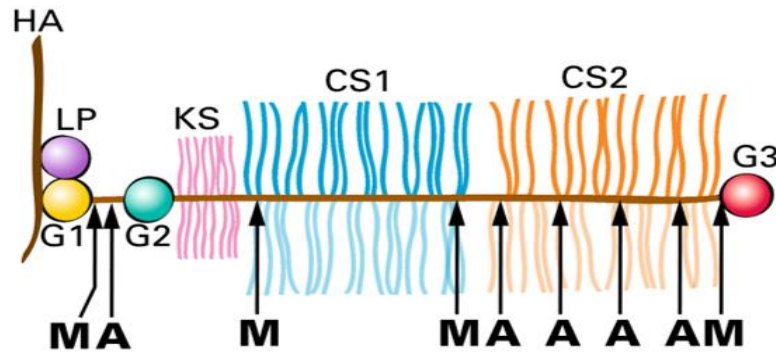


Figure 17 : Représentation schématique de la structure de l'agrécane. L'agrécane est représenté en association avec l'acide hyaluronique (HA) et la protéine de liaison (LP) dans les agrégats de protéoglycanes. Les régions globulaires de la protéine centrale d'agrécane sont indiquées (G1, G2 et G3) conjointement avec les régions de la protéine centrale substituées par des chaînes de kératane sulfate (KS) ou de chondroïtine sulfate (CS1 et CS2). L'emplacement des sites de clivage le long de la protéine centrale pour les MMP (M) et les agrécanasés (A) est indiqué au bas de la figure (Mort et al., 2016).

II.1.1.2.2 La famille des SLRPs

Cette famille est caractérisée par un **domaine central** composé d'une série de **répétitions** adjacentes riches en **leucine** bordées à chaque extrémité par des domaines liés par un pont disulfure. Elle est divisée en **cinq classes** sur la base de leurs propriétés fonctionnelles et structurales communes et deux sous-familles selon la présence des chaînes de GAGs à dermatane sulfate (DS) ou kératane sulfate (KS) (Figure 18). La première sous-famille regroupe ceux à DS, le biglycan (DS-PGI), la décorine (DS-PGII) et l'asporin (DS-PGIII). La deuxième sous-famille regroupe ceux à KS, la fibromoduline et le lumican et d'autres types (Schaefer and Iozzo, 2008).

Le cartilage articulaire contient quatre types de cette famille : le **lumican**, la **décorine**, le **biglycan** et la **fibromoduline** (Ni et al., 2014). Ces trois derniers PGs sont présents tout au long de la vie.

Il a été démontré que tous les SLRPs interagissent avec les collagènes fibrillaires de la matrice extracellulaire, bien que leur site et la force de leur interaction puissent varier. L'importance de ces molécules dans l'organisation matricielle est illustrée par les anomalies associées aux souris *knockout* pour les SLRPs (Kalamajski and Oldberg, 2010). Le tableau 4 résume les différents membres de la famille

SLRPs, leur distribution tissulaire ainsi que les anomalies que provoquent la déficience en ces PGs chez des souris *knockout*.

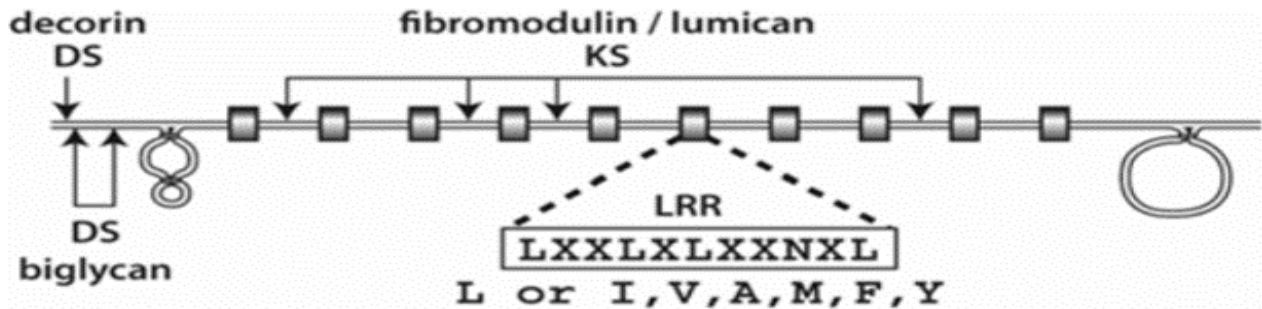


Figure 18 : Les domaines structuraux des SLRPs. La protéine core de la décorine, du biglycan, de la fibromoduline ou du lumican est représentée avec deux domaines liés au pont disulfure adjacent à dix domaines de répétition riches en leucine (LRR). Chaque domaine LRR est composé de la séquence LXXLXLXXNXL, où L est principalement la leucine mais peut également être I, V, A, M, F ou Y et X peut être n'importe quel acide aminé. Dans le cas de la décorine ou du biglycan, une ou deux chaînes CS/DS, respectivement, résident dans la région N-terminale. Dans le cas de la fibromoduline et du lumican, une à quatre chaînes KS peuvent résider entre les domaines LRR (Roughley, 2006).

SLRP	Abundant in	Knockout mice phenotype	Upregulated in
Biglycan (BGN, PGS1)	Skin, tendon, bone, cartilage, kidney, muscle, prenentin, and PDL	Bone mass reduction, aortic rupture, and weak tendons	Fibrosis and atherosclerosis
Decorin (DCN, PGS2)	Skin, tendon, cartilage, kidney, muscle, prenentin, and PDL	Fragile skin, weak tendons, lower airway resistance, slow wound healing and angiogenesis	Fibrosis, cancer, and atherosclerosis
Asporin (ASPN)	Liver, heart, aorta, uterus, perichondrium, periosteum, prenentin, and PDL		Scleroderma and osteoarthritis
Fibromodulin (FMOD)	Tendon, ligament, cartilage, prenentin, and PDL	Weak tendons and osteoarthritis	Fibrosis, cancer, and atherosclerosis
Lumican (LUM)	Widespread, prenentin, and PDL	Fragile skin and opaque cornea	Scleroderma and cancer
Prolargin (PRELP)	Cartilage, lung kidney, and skin		
Osteoadherin (OSAD)	Mineralized bone		
Keratocan (KERA)	Cornea, sclera, tendon, ligament, and cartilage	Thinner and flatter cornea	
Epiphyhan (EPYC, PG-Lb, DSPG-3)	Cartilage		
Opticin (OPT)	Vitreous (eye)		
Osteoglycin (OGN, MIME, mimecan, OIF)	Cornea and skin	Slight skin fragility, but clear (normal) cornea	
Chondroadherin (CHAD)	Cartilage, cornea, lens, and retina		
Tsukushin (TSK)	Primitive streak and Hensen's node (gastrulation)		

Tableau 4 : Tableau représentant la distribution tissulaire des SLRPs et le phénotype des souris *knockout* déficientes en certaines membres de cette famille (Kalamajski and Oldberg, 2010).

II.1.1.2.2.1 La décorine

La décorine est un membre de la famille des SLRPs qui joue un rôle important dans le **développement** et l'**assemblage** de la MEC des tissus. Sa protéine core est codée par un gène localisé sur le chromosome 12 et sa masse moléculaire est d'environ 40 kDa (Danielson et al., 1993 ; Lewis et al., 2010). Elle contient une **seule chaîne GAG**, CS ou DS (Figure 19). Les chaînes de GAG de type CS sont principalement présentes dans le cartilage, tandis que les chaînes de GAG de type DS sont présentes dans d'autres tissus. En ce qui concerne le cartilage, cette molécule se trouve dans toute la matrice cartilagineuse articulaire mais se concentre près de la surface (Lewis et al., 2010).

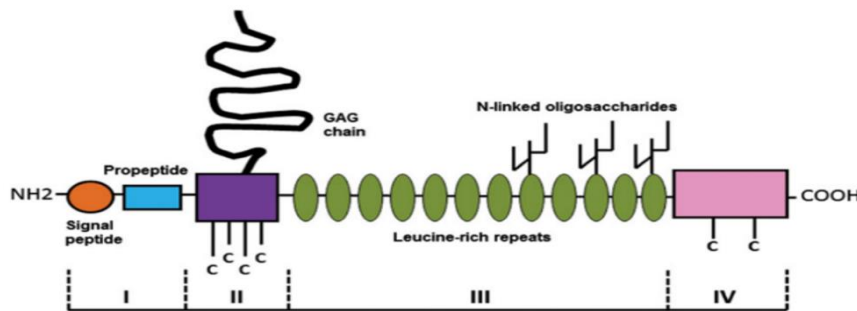


Figure 19 : Schéma de la structure de décorine. La chaîne de GAG est attachée à un résidu sérine appartenant au domaine II de la protéine core (Sainio and Järveläinen, 2018).

Un des rôles cruciaux de la décorine c'est l'**arrangement** des fibres de collagènes. D'ailleurs, par l'intermédiaire de sa chaîne DS, elle se lie séparément sur les fibres de collagènes adjacents en interface avec sa protéine core, une interaction essentielle pour la bonne formation des fibrilles et leur espacement. En effet en l'absence de décorine comme dans le cas des souris déficientes, les fibres de collagène deviennent plus fines alors qu'en présence de décorine sans sa chaîne GAG, les fibres de collagène s'épaississent (Danielson et al., 1997 ; Seidler, 2012).

Non seulement cette interaction est nécessaire pour une bonne fibrillation mais aussi elle sert à moduler la **bioactivité** de certains facteurs de croissance. C'est ainsi que la décorine par son interaction avec le collagène séquestre le TGF- β , ce qui favorise son isolement dans la MEC et son incapacité de se lier sur son récepteur (Markmann et al., 2000).

II.1.1.2.2.2 Le biglycan

Ce protéoglycane comme la plupart des autres PGs est impliqué dans la régulation de certains processus biologiques, parmi lesquels, la **réaction inflammatoire** et la **différenciation cellulaire** (Nastase et al.,

2012). En effet, un modèle animal d'inflammation rénale a montré une surexpression du biglycan associée à une augmentation du nombre de cellules infiltrantes, suggérant ainsi un rôle immunitaire (Hsieh et al., 2014).

Les souris invalidées pour ce gène développent une ostéoporose liée à l'âge, et les ostéoblastes dépourvus de biglycan présentent un défaut de différenciation, suggérant ainsi l'implication de ce PG dans le **développement squelettique** (Schaefer and Iozzo, 2008).

II.1.1.2.3 La famille de syndécans

Les syndécans (SDCs) définissent une classe de protéoglycanes **transmembranaires** qui fait connecter la surface des cellules à la matrice extracellulaire sous-jacente. Cette famille regroupe quatre membres (SDC 1-4) de protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG), dont le poids moléculaire des protéines cores se situe entre 22 et 45 KDa. Ces différents types de syndécans sont présents chez l'homme et d'autres vertébrés, tandis que les invertébrés ne possèdent qu'un seul type (Rapraeger, 2001 ; Couchman, 2003).

Les quatre membres de cette famille diffèrent par les types de chaînes de GAGs qui les lient et par leur expression dans diverses cellules et tissus. C'est ainsi que le SDC-2 et le SDC-4 ne contiennent que des chaînes HS-GAG, tandis que le SDC-1 et le SDC-3 contiennent également les chaînes CS GAG.

Le syndécan-1 (SDC-1) est principalement exprimé dans les cellules épithéliales, dans certains leucocytes ainsi que pendant la gastrulation. De plus, son expression est régulée positivement dans le cartilage articulaire lors de la dégradation du cartilage chez un modèle de souris arthrosique (Salminen-Mankonen et al., 2005).

Nous mentionnons ici particulièrement le syndécan-4 (SDC-4) qui contrairement aux autres SDCs, est **largement exprimé** dans la plupart des types cellulaires (Leonova and Galzitskaya, 2013). Il a été démontré que le SDC-4 est exprimé dans le tissu cartilagineux au cours de l'embryogenèse chez la souris, où il est fortement exprimé dans les chondrocytes hypertrophiques, le cartilage épiphysaire et au cours de l'ossification endochondrale (Pap and Bertrand, 2013).

De même que les autres familles de PGs, la famille des SDCs est impliquée dans une grande variété de **fonctions biologiques** (Figure 20). En bref, les syndécans se lient à de nombreux facteurs de croissance, notamment par leurs chaînes HS, et régulent les gradients de morphogènes au cours du développement (Christian, 2012). En effet, l'implication de cette famille dans la squelettogenèse a été mise en évidence dès 1990, où il a été montré que les syndécans sont exprimés au cours du développement précoce des

membres (Pacifci et al., 2005). De plus, les syndécans jouent un rôle clé en tant que corécepteurs pour de nombreux récepteurs à tyrosine kinase et peuvent également fonctionner comme récepteurs pour les lipoprotéines athérogènes (Fuki et al., 1997; Mahley and Huang, 2007).

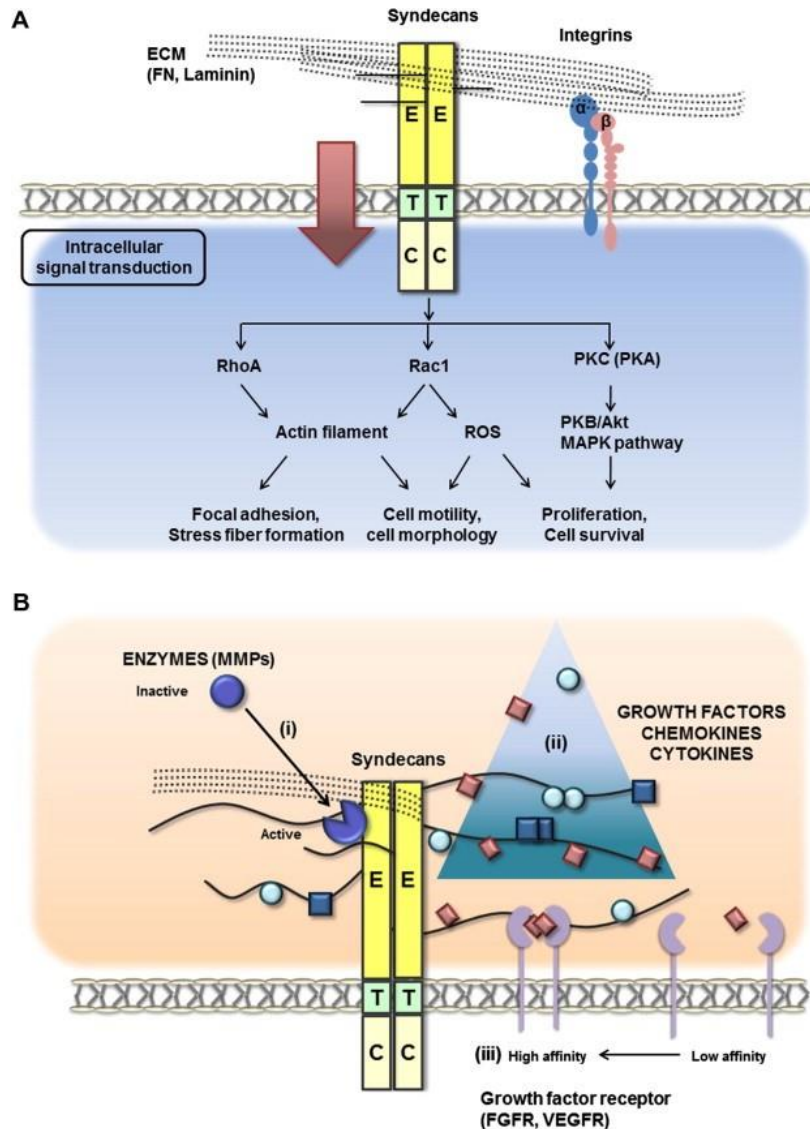


Figure 20 : Double rôle de la famille des SDCs membranaires. A- Un récepteur d'adhésion régulant les événements de signalisation intracellulaires. **B-** récepteur d'accueil, un syndécan peut réguler les événements extracellulaires. Lorsque les ligands extracellulaires se lient au syndécan, (i) les enzymes extracellulaires telles que les MMPs deviennent activées, (ii) les ligands solubles sont beaucoup moins dilués et peuvent atteindre des concentrations locales élevées, et (iii) les ligands extracellulaires tels que les facteurs de croissance. E, domaine extracellulaire ; T, domaine transmembranaire ; et C, domaine cytoplasmique (Kwon et al., 2012).

II.1.1.2.4 La famille de glypicans (GPC)

C'est une famille de PGs à **HS** ancrés dans la membrane plasmique via une fraction lipidique C-terminale appelée le **glycosyl phosphatidylinositol** (GPI). Cette famille regroupe six membres, codés par six gènes indépendants dans le génome des mammifères, qui peuvent être subdivisés en deux grandes classes ayant 25% d'homologie : GPC1/2/3/6 et GPC4/5 avec ses orthologues *Dally* et la protéine *Dally-like* chez la drosophile et deux sous-types appelés *Gpn-1* et *Lon-2* exprimés chez *C. elegans* (Filmus et al., 2008 ; Fico et al., 2011). Le génome de la souris possède également six glypicans, identifiés par la même nomenclature (tableau 5).

Gene name	Synonyms	Location	Gene accession number (GenBank)	Number of amino acids	Reference
Human					
GPC1	Glypican	2q35-37	NM_002081	558	[40]
GPC2	Cerebroglycan	7q22.1	NM_152742	579	[41]
GPC3	OCI-5, MXR7	Xq26	NM_004484	580	[42]
GPC4	K-glypican	Xq26.1	NM_001448	556	[9]
GPC5		13q32	NM_004466.3	572	[43]
GPC6		13q32	NM_005708.2	555	[44]
Drosophila					
Dally		3L,66E1-66E3	NM_079259.2	626	[45]
Dally-like protein (Dlp)		3L,70E5-70E7	NM_206353.1	939	[46]

Tableau 5 : Tableau représentant les différents membres de la famille des Glypicans, leurs localisations chromosomiques et le nombre d'acides aminés qui les constituent, chez l'homme et les drosophiles (Filmus et al., 2008).

Fonctionnellement, les glypicans sont capables, par des interactions électrostatiques via les chaînes de HS, d'agir comme des **récepteurs** ou de jouer le rôle de **co-récepteurs** de faible affinité. Ainsi, il a été montré que le glypican-3 se lie à Fzd agissant ainsi directement sur la modulation de la signalisation canonique de Wnt (Capurro et al., 2014) (Figure 20). C'est ainsi que les souris déficientes en GPC3 présentent des altérations dans la signalisation Wnt et Hh (Song et al., 2005 ; Capurro et al., 2008). Le GPC3 et le GPC1 agissent comme des régulateurs négatifs de la signalisation Hh (Figure 21), le GPC5, contenant cinq chaînes de GAG, agit comme un régulateur positif (Capurro et al., 2014). En outre, le GPC3 favorise la

croissance des cellules de carcinome hépatocellulaire en stimulant la signalisation de Wnt et de ce fait il est considéré comme un biomarqueur pour le diagnostic de ce type de cancer. Sa forme soluble supprime la prolifération et la migration des cellules HCC (Human Carcinoma Cells) *in vitro* et également *in vivo* dans le modèle de xénotransgreffe de souris (Zittermann et al., 2010). Les mutations du GPC3 sont à l'origine du syndrome rare Simpson-Golabi Behmel (**SGB**) lié au chromosome X chez l'homme, caractérisé par une croissance anormale prénatale et postnatale, des anomalies crâniofaciales, des anomalies cardiovasculaires, une dysplasie rénale et des malformations des voies urinaires (Young et al., 2006 ; Filmus and Capurro, 2014). En outre, il a été montré que la carence en GPC-6 provoque une Omo dysplasie, une maladie génétique caractérisée par des anomalies cardiaques, un retard mental, des anomalies squelettiques et un nanisme (Campos-Xavier et al., 2009).

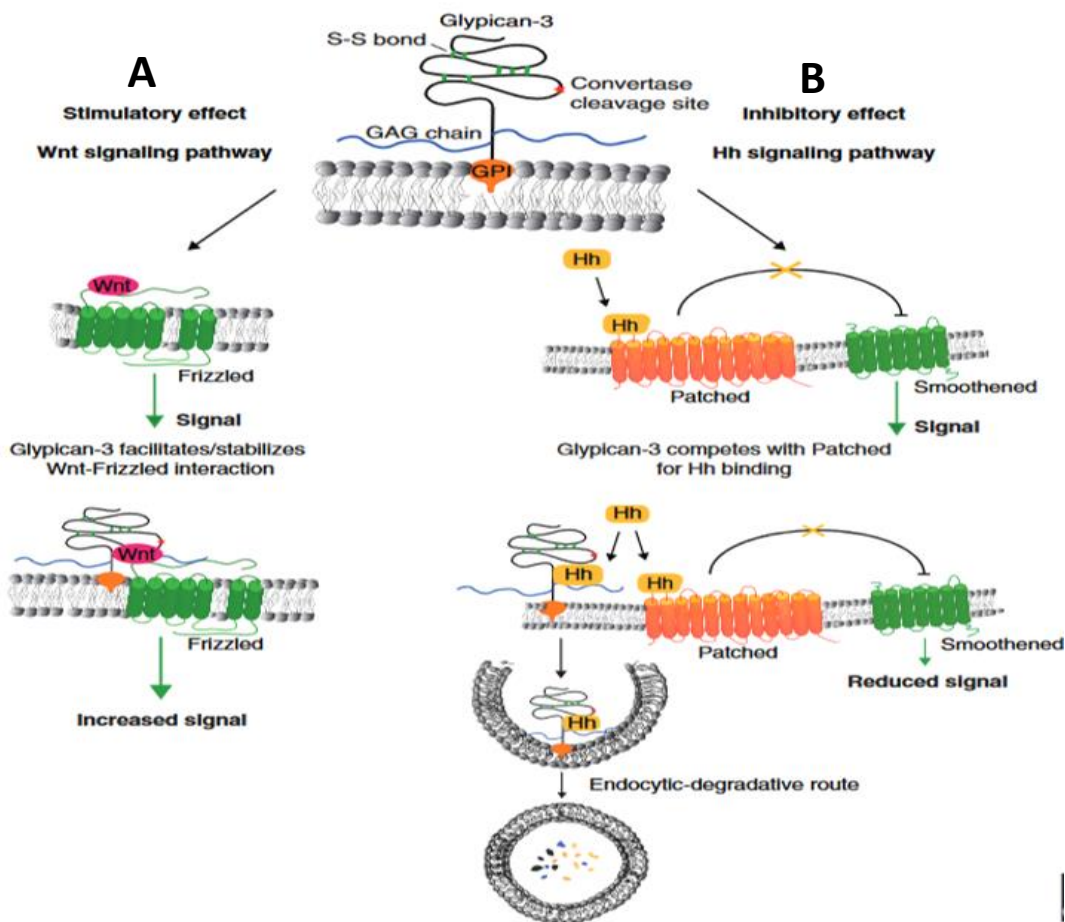


Figure 21 : Effets de GPC3 sur la signalisation cellulaire. A- Un effet positif sur la voie de Wnt en favorisant son interaction Fzd. **B-** Un effet négatif sur la voie d'Hh. La liaison d'Hh à son récepteur Patched (Ptc) déclenche la voie de signalisation en bloquant l'activité inhibitrice de Ptc sur Smoothened. GPC3 entre en compétition avec Ptc ce qui provoque l'endocytose d'Hh ainsi une réduction de sa disponibilité pour sa liaison sur Ptc (Filmus et al., 2008).

II.1.1.2.5 Le bétaglycan

Le bétaglycan est un récepteur du type **TGF- β III** (TGF β 3) (López-Casillas et al., 1994). C'est un PG **transmembranaire** appartenant à la superfamille des co-récepteurs du TGF- β (Figure 22) exprimé à la surface cellulaire sous forme d'homodimères liés de façon non-covalente.

Son domaine extracellulaire contient **deux sites** d'attachements des chaînes de GAG de HS et CS (López-Casillas et al., 1994) (Figure 22). Ces chaînes ne sont pas essentielles pour la liaison du ligand à la protéine core (Wiater et al., 2006) mais peuvent être liées à d'autres classes de facteurs de croissance, tels que les FGFs (López-Casillas et al., 1994). Elles semblent contribuer à la fonction du bétaglycan, car la mutation des sites d'attachement des GAGs réduit l'inhibition de la migration médiée par le bétaglycan (Mythreya and Blobel, 2009). De plus, elles peuvent **bloquer l'accès des ligands** à leurs récepteurs dans certains types de cellules, perturbant ainsi la signalisation et la fonction du TGF- β (Eickelberg et al., 2002). Son domaine cytoplasmique est hautement conservé entre les espèces et il a été démontré qu'il a un impact important sur sa fonction. En ce qui concerne sa partie intracellulaire, elle contient un domaine de liaison PDZ qui sert à moduler la topologie du complexe et à réguler la migration cellulaire via l'interaction avec la β -arrestine par la voie de SMADs (Mythreya and Blobel, 2009).

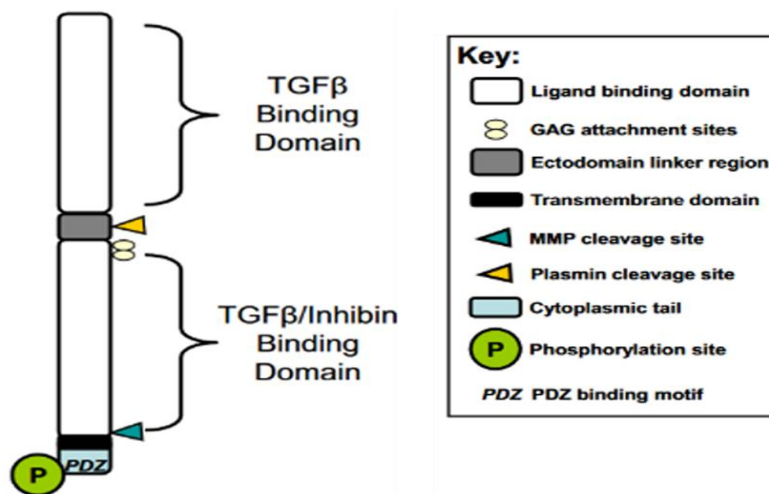


Figure 22 : Structure du bétaglycan. *Caractéristiques structurales de la forme complète de bétaglycan, représentant le domaine de liaison clé, les sites de clivage enzymatique et les résidus intracellulaires importants pour l'association des protéines adaptatrices. Les événements de clivage protéolytique et la modification post-traductionnelle des chaînes latérales de GAGs entraînent la génération de formes multiples de bétaglycan. L'ectodomaine peut être clivé par les métalloprotéases (MMPs), près de la région transmembranaire, pour générer un récepteur soluble, capable de lier un ligand (Bilandzic and Stenvers, 2011).*

II.2 Les PGs au niveau de la matrice osseuse

Le rôle des **PGs** au niveau des **os** et durant la formation osseuse n'est pas très bien élucidé. La régulation autocrine et /ou paracrine durant la formation osseuse et la résorption au cours du développement est un mécanisme important impliqué dans l'**homéostasie osseuse** (Siddiqui and Partridge, 2016). Cette régulation ne pourrait se faire d'une façon aléatoire mais dirigée par des composants de la **matrice extracellulaire**. Cette matrice est souvent impliquée directement ou indirectement dans la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire (Kresse and Schönherr, 2001 ; Mythreya and Blobe, 2009). En ce qui concerne la matrice extracellulaire, celle-ci est formée d'une matrice extracellulaire **minéralisée** et d'une matrice **organique** constituée à 90% du **collagène de type I** sécrété par les ostéoblastes et d'autres composants matriciels dont les protéines non collagéniques parmi lesquelles, l'ostéocalcine, l'ostéopontine, l'ostéonectine, la fibronectine, la sialoprotéine osseuse de type II, les BMPs (bone morphogenetic proteins) et les facteurs de croissance (Alford et al., 2015). Cette matrice renferme également des petits **protéoglycanes** riches en leucines (SLRPs) incluant la décorine, le biglycan, la lumican, l'ostéoadhérine ainsi que les protéines sériques (Lamoureux et al., 2007 ; Kram and Young, 2014).

Les **SLRPs** sont impliqués dans le développement squelettique, la structure crâniofaciale (Young et al., 2002 ; Ameye and Young, 2002), la formation des dents (Goldberg et al., 2005) et la fibrillogenèse du collagène (Ameys et al., 2002). Des modèles de souris knockout déficientes en PGs ont été générées afin d'étudier leur rôle dans la formation osseuse. Ainsi, les souris déficientes en **biglycan**, présentent une altération de la formation osseuse postnatale conduisant à l'apparition précoce de l'ostéoporose (Danielson et al., 1997 ; Chen et al., 2002 ; Wallace et al., 2006). Un autre exemple est celui des souris déficientes en **décorine**. Ces souris n'ont pas montré de changements histologiques ou macroscopiques osseux mais présentent des fibres de collagènes de taille, distribution, densité et morphologie anormales (Danielson et al. 1997). Des défauts graves dans la forme et la taille des fibres du collagène osseux chez les souris double déficientes en biglycan et décorine ont été détectés au microscope électronique à transmission, soutenant l'hypothèse selon laquelle ces PGs jouent un rôle important dans l'assemblage et la fonction du collagène. De plus, ces souris montrent une diminution de la minéralisation osseuse (Corsi et al., 2002 ; Nikitovic et al., 2012). Le **lumican** joue également un rôle essentiel dans la minéralisation osseuse où il est exprimé d'une façon importante par les ostéoblastes matures et est considéré comme le PG majeur de la matrice osseuse (Raouf et al., 2002). Des études au niveau cellulaire ont montré que ce

PG a un effet considérable sur la détermination du phénotype structural des fibres de collagène matures (Svensson et al., 2000 ; Raouf and Seth, 2002 ; Krishnan et al., 2012). Non seulement les PGs à base de CS sont impliqués dans la formation osseuse, mais également ceux à chaînes de HS. C'est l'exemple du **perlécane**, où les souris déficientes en ce type de PG meurent à l'âge de 10 jours. Les souris meurent en raison d'anomalies vasculaires céphaliques et présentent à la fois une chondrodysplasie, un manque d'intégrité du cartilage et des effets sur les tissus osseux et le processus de calcification (Arikawa-Hirasawa et al., 1999 ; Lowe et al., 2014).

Il est connu que les PGs modulent la **bioactivité** des facteurs de croissance et des cytokines par leur interaction avec leurs chaînes de GAGs notamment. Ainsi, des études menées sur les cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse des souris doubles déficientes en biglycan et décorine, ont montré une augmentation de la signalisation du TGF- β suite à l'incapacité de séquestration dans la MEC exercée par le biglycan et la décorine. Cette augmentation induit une diminution du nombre des ostéoblastes à cause de l'augmentation de l'apoptose (Bi et al., 2005). Les PGs régulent la **biodisponibilité** et l'activité de différents facteurs dont les BMPs qui sont des facteurs essentiels à la différenciation cellulaire des cellules souches mésenchymateuse en ostéoblastes et chondroblastes (Beederman et al., 2013 ; Lach et al., 2014). Ils régulent également des gènes importants comprenant des facteurs de signalisation (SHH, IHH) (Krishnan et al., 2001 ; Seki and Hata, 2004 ; Yang et al., 2015), des antagonistes (Noggin) (Devlin et al., 2003 ; Cao and Chen, 2005), des protéines de la matrice extracellulaire (la fibromoduline) (Gori et al., 2001 ; Balemans and Van Hul, 2002 ; Ortuño et al., 2010) et des facteurs de transcription (Sox9, Cbfa1/Runx2, Osx) essentiels dans la formation osseuse (Nakashima et al., 2002 ; Yamaguchi et al., 2008 ; Zhang, 2010 ; Wu et al., 2016)..

LA XYLOSYLTRANSFERASE I

III. Xylosyltransférase I

La xylosyltransférase (EC 2.4.2.26, XT) est l'enzyme **initiale** impliquée dans la biosynthèse des chaînes de glycosaminoglycanes. Cette enzyme catalyse le transfert du D-xylose de l'UDP-D-xylose sur des résidus sérines spécifiques de la protéine core pour initier la synthèse des chaînes de CS et de HS des PGs (Figure 23) (Roden, 1980 ; Kearns et al., 1991 ; Götting et al., 1999). Elle est considérée comme l'enzyme **limitante** de la biosynthèse de ces chaînes et existe sous **deux isoformes**, la XT-I et la XT-II (protéines homologues à 80%) (Götting et al., 2000 ; Schön et al., 2006). Tous les organismes supérieurs présentent les deux gènes de xylosyltransférase, alors qu'un seul gène codant pour cette enzyme est présent dans le génome de mouches et de vers (Götting et al., 2000 ; Wilson, 2002 ; Hwang et al., 2003). La levure et les bactéries ne possèdent aucun orthologue de la xylosyltransférase.

Au cours de nos travaux de thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés à la **xylosyltransférase-I (XT-I)**.

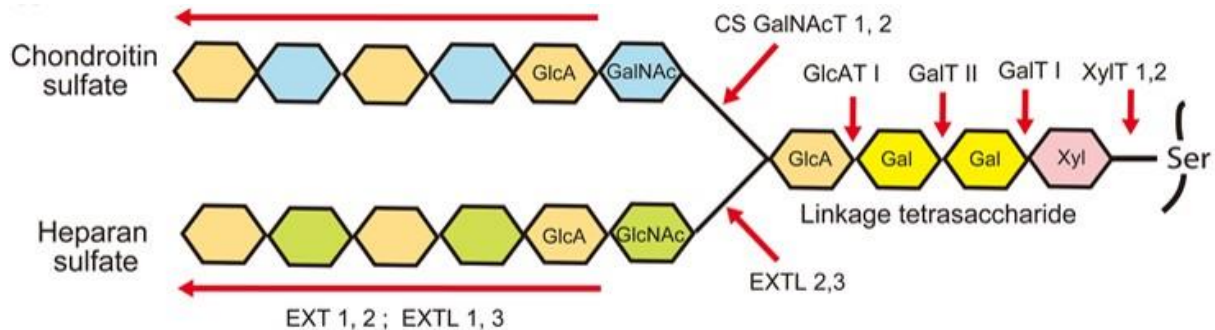


Figure 23 : Représentation schématique de la biosynthèse des chaînes de GAGs par les différentes glycosyltransférases. Cette synthèse débute par l'ajout de l'amorce tétrasaccharidique : *GlcA1,3Gal1,3Gal1,4Xyl* commune aux chaînes de CS et de HS, sur des résidus sérine de la protéine core. Cette formation est initiée par les xylosyltransférases (XT-I et XT-II) catalysant le transfert du D-xylose de l'UDP-D-xylose sur ces résidus. Ensuite, le premier résidu GalNAc est transféré sur le résidu GlcA par la GalNAcT 1, 2, qui initie l'assemblage des CS. D'autre part, l'addition du résidu GlcNAc est catalysée par les enzymes EXT1 et EXT2 favorisant ainsi la polymérisation des chaînes de HS (Maeda, 2015).

III.1 Localisation chromosomique

Le gène codant l'enzyme XT-I humaine, *XylT1*, est situé sur le chromosome 16p13.1, alors que le gène murin est situé sur le chromosome 7 et partage une structure exon-intron similaire au gène humain. Le gène humain *XylT1* a une longueur de plus de 300 kb et il code pour une protéine de masse moléculaire de 108 KDa (Götting et al., 2000 ; Wilson, 2004 ; Götting et al., 2007).

III.2 Structure de la protéine et localisation intra et inter cellulaire

La XT-I est une glycosyltransférase membranaire qui adopte une **topologie de type II**. Certains groupes indiquent une localisation dans le réticulum endoplasmique, tandis que d'autres ont présenté des données montrant la localisation des xylosyltransférases au niveau du Golgi (Hoffmann et al., 1984 ; Müller et al., 2005 ; Schön et al., 2006). La XT-I est constituée de **cinq domaines** : un domaine cytoplasmique du côté N-terminal, un domaine transmembranaire, une tige (stem) indispensable pour la rétention de l'enzyme au niveau de l'appareil de Golgi, un domaine catalytique et un domaine XylO_C, dont la fonction est inconnue, du côté C-terminal (Schön et al., 2006 ; Müller et al. 2006 ; Lairson et al., 2008). La structure cristalline de cette enzyme a été résolue en 2018 par Briggs et Hohenester qui ont pu déterminer la première structure cristalline d'un peptide O-xylosyltransférase (Figure 24). Des mutations au niveau du domaine XylO_C n'ont pas empêché l'activité catalytique de la XT-I, ce qui montre que ce domaine n'est pas requis pour l'activité catalytique de la XT-I. Il a été supposé que ce domaine est requis pour la sécrétion et le repliement de la XT-I (Briggs and Hohenester, 2018). En ce qui concerne la localisation tissulaire de la XT-I, l'analyse de son expression montre que cette enzyme est exprimée dans la plupart des tissus parmi lesquels le pancréas, le rein, le placenta (Götting et al., 2000), le cartilage (Venkatesan et al., 2009) ainsi que dans le poumon, le cerveau, le cœur, le foie et les muscles squelettiques (Götting et al., 2007).

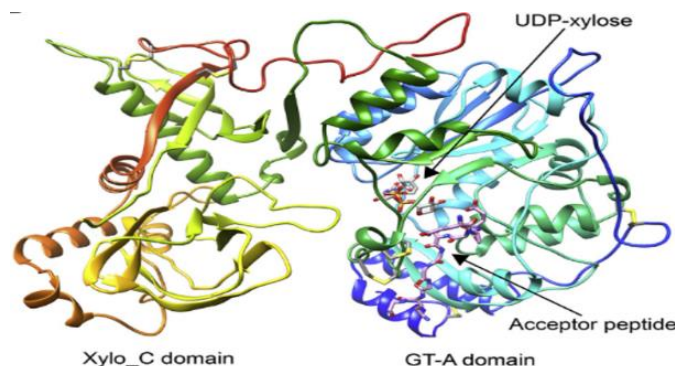


Figure 24 : Structure cristalline du complexe XT-I, UDP-xylose et un peptide accepteur humain.

Structure cristalline de la XT-I humaine. Bleu : N-terminale. Rouge : C-terminale. Argent : UDP-xylose. Rose : peptide accepteur (Briggs and Hohenester, 2018).

III.3 Implication de la xylosyltransférase I dans certaines pathologies

Les protéoglycanes jouent un rôle important dans de nombreux processus **physiologiques** et **physiopathologiques**. Bon nombre de ces processus, en particulier ceux qui s'accompagnent d'une accumulation de composants de la matrice extracellulaire et du remodelage du tissu conjonctif, sont caractérisés par une augmentation de la biosynthèse et du dépôt des protéoglycanes, la fibrose (Koslowski et al., 2001), la sclérodémie systémique (SSc) (Götting et al., 1999) et le Pseudoxanthoma elasticum (PXE) (Götting et al., 2005).

La XT-I semble jouer un rôle important dans le **cartilage** (Venkatesan et al., 2012) et dans la **régénération neuronale** (Hurtado et al., 2008). En effet, plusieurs études ont été réalisées afin d'élucider la fonction de la XT-I durant la chondrogenèse et dans le développement des maladies arthrosiques. C'est ainsi que l'analyse de la régulation de la biosynthèse des PGs durant la différenciation *in vitro* des CSM en cellules chondrogéniques a montré une régulation positive de l'expression de la XT-I dans les stades précoces de la chondrogenèse (Prante et al., 2006).

De plus, notre groupe a étudié l'importance de la XT-I dans le processus de dégradation et de réparation du cartilage dans un modèle de rat où la polyarthrite rhumatoïde a été induite à l'antigène (AIA : Adjuvant-Induced arthritis), et durant le processus de réparation du cartilage après dégradation aménagée par injection intra-articulaire de papaïne. Il a ainsi montré que l'expression du gène de la XT-I est inhibée au cours du processus de dégradation du cartilage. En revanche, cette expression est induite dans les phases précoces de la réparation du cartilage (Venkatesan et al., 2009).

Ce rôle clé de la XT-I dans le cartilage a été ensuite étudiée durant le processus d'arthrose chez l'homme. Dans cette étude, Venkatesan et al. ont étudié l'expression et l'activité de la XT-I ainsi que la synthèse des PGs dans le cartilage humain arthrosique. Les résultats ont montré que la synthèse et la teneur en PGs sont fortement augmentées dans les zones cartilagineuses juxtaposant les lésions comparées au cartilage provenant de régions macroscopiquement « normales », tandis qu'elles sont significativement diminuées au niveau des lésions à un « stade avancé ». De façon intéressante, l'expression de la XT-I est fortement induite au niveau des zones juxtaposant les lésions et inhibée au niveau des lésions suggérant que la XT-I régule la synthèse des PGs au niveau du cartilage (Venkatesan et al., 2012).

III.4 Les variants génétiques de la *XylTI*

Plusieurs syndromes et troubles sont associés à des mutations au niveau des gènes codant pour les enzymes de synthèse des GAGs. Les mutations dans le gène de la *GALT-I* sont associées au syndrome progéroïde d'Ehlers-Danlos de type 1 (Malfait et al., 2013) et le syndrome de Larsen de l'île de La Réunion (Cartault et al., 2015). Le premier syndrome est caractérisé par un retard de développement, une petite taille et un aspect vieilli alors que le deuxième est caractérisé par de multiples luxations, une hernie et des traits faciaux distinctifs. Dans le cas de la *GALT-II*, les mutations au niveau de ce gène sont associées au syndrome progéroïde d'Ehlers-Danlos de type 2 caractérisé par des cheveux rares, une ostéopénie et une luxation radiale de la tête, ainsi qu'à la dysplasie spondyloépiméphysaire à laxité articulaire de type 1 caractérisée par une contracture du coude et une dysmorphie crâniofaciale légère (Nakajima et al., 2013). Des mutations du gène de la *GlcAT-I* sont associées au syndrome de Larsen de type B3GAT3 caractérisé par des luxations articulaires multiples, une petite taille, un dimorphisme crâniofacial et des malformations cardiaques congénitales (Budde et al., 2015).

Dans le cas de la XT-I, le polymorphisme du gène *XylTI* a été associé à plusieurs maladies telles que le diabète de type I (Schön et al., 2005), la néphropathie diabétique (Schön et al., 2006), le Pseudoxanthome élastique (PXE) (Götting et al., 2005), l'arthrose et l'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA) (Götting et al., 2008). Cette dernière est une maladie vasculaire caractérisée par des dilatations artérielles localisées. Cette maladie est provoquée par un remodelage destructif de la matrice extracellulaire dans la paroi vasculaire.

Le métabolisme des PGs est perturbé chez les patients diabétiques et une baisse de la synthèse des HSPGs est observée dans les membranes basales. Dans ce type de diabète, l'activité XT est diminuée, entraînant une réduction du contenu en GAGs dans divers tissus, notamment dans les artères (Vogl-Willis and Edwards, 2004) et les reins (Vernier et al., 1992).

Les mutations perturbant la synthèse des PGs affectent généralement les tissus squelettiques et peuvent affecter le développement ostéoarticulaire. Une mutagenèse au hasard chez le poisson zèbre suivie par un criblage de phénotypes squelettiques des larves a révélé que des mutations au niveau des gènes *fam20b* (family with sequence similarity 20) et *XylTI* induisent une ossification accrue associée à une déficience dans la synthèse de la matrice cartilagineuse (Eames et al., 2011). Les mutants ne sont pas parvenus à produire des niveaux de PGs semblables à ceux présents dans les poissons sauvages et initient la formation osseuse péri-chondrale de façon prématurée (Figure 25). Les analyses ultrastructurales ont montré une

organisation aberrante de la matrice et des caractéristiques précoces d'hypertrophie chondrocytaire chez les mutants. Cette étude réalisée par Frank Eames et al. en 2011, était la première étude *in vivo* qui révèle que les gènes *fam20b* et *Xylt1* sont impliqués dans la régulation du développement ostéoarticulaire.

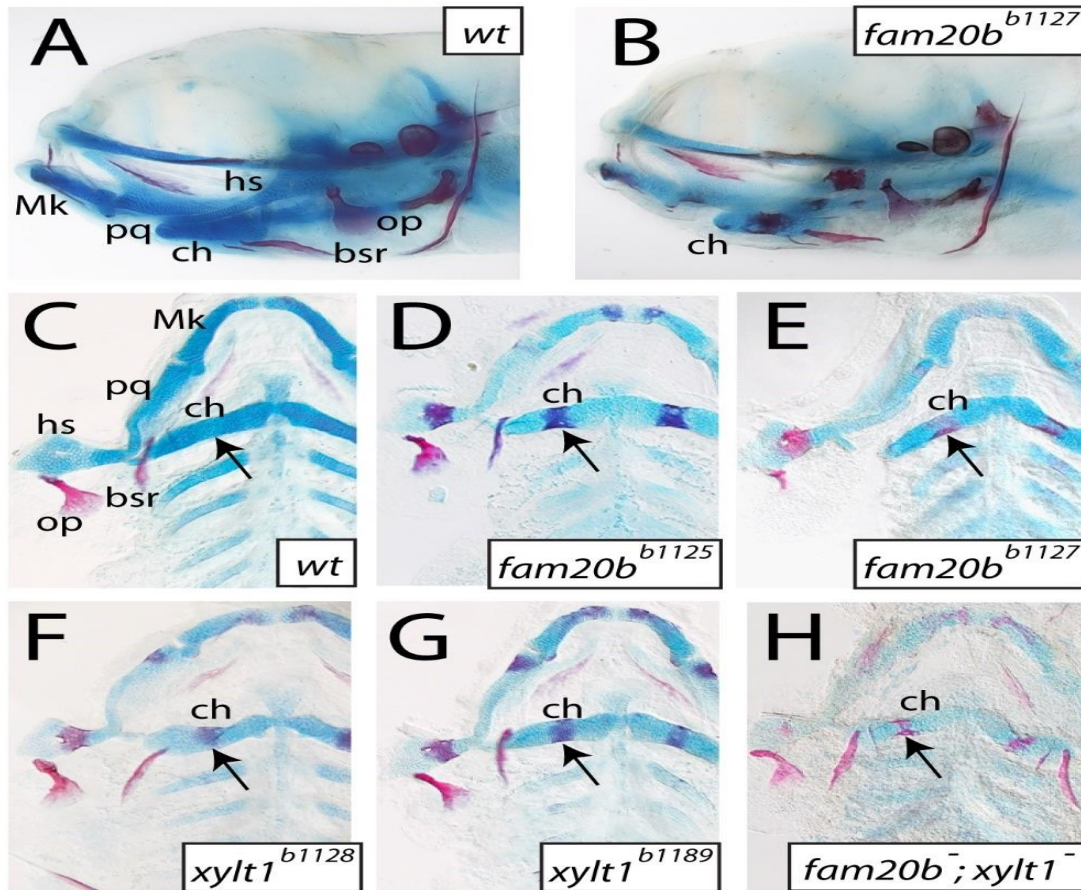


Figure 25 : Changements phénotypiques du squelette crâniofaciale chez les larves des poissons zèbres mutées pour la *Xylt1* et la *fam20b* évaluée par coloration au bleu Alcian et au rouge Alizarine. A, B- Vue latérale de la tête. C-H- Vue ventrale des squelettes pharyngés. *Fam20b^{b1152}* et *fam20b^{b1127}* : les deux loci mutés de *fam20b* ; *xylt1^{b1189}* et *xylt1^{b1128}* : les deux loci mutés de *xylt1* ; *fam20b⁻* ; *xylt1⁻* : double mutation chez les poissons zèbres (Eames et al., 2011).

Deux ans après cette étude, une étude clinique sur deux patients a pu identifier une mutation homozygote (c.1441C>T, [p.R481W]) au niveau du gène de la XT-I associée à un syndrome autosomique récessif, caractérisé par une petite taille, des traits faciaux distincts, des altérations de la répartition de la masse graisseuse, des modifications squelettiques légères et une déficience intellectuelle modérée (Figure 26). Les fibroblastes de ces patients produisent une décorine sans chaînes de GAGs, une expression réduite de la XT-I, une altération de la localisation intracellulaire mais une activité enzymatique similaire aux témoins (Schreml et al., 2014).



Figure 26 : Caractéristiques phénotypiques de deux patients montrant une mutation homozygote R481W, pour la XylT1. Les deux patients présentent un nanisme, des traits faciaux distincts, des modifications squelettiques légères une déficience intellectuelle modérée (Schreml et al., 2014).

En 2014, Mis et al. ont généré une souris mutante au niveau de la *Xylt1* par un traitement à la N-éthyl-N-nitrosourée (mutation ENU). La mutation de la XT-I à la position p.W932R est associée à une réduction de la longueur du corps (nanisme) de 15-20% au stade embryonnaire E14.5 (Figure 27 I). À l'âge adulte, les mutants présentent également une réduction de la taille, une cage thoracique plus petite et un élargissement des côtes (Figure 27 II). L'analyse des mécanismes moléculaires indique que les chondrocytes des mutants expriment plus de collagène X et d'Ihh suggérant une maturation précoce. En ce qui concerne l'enzyme XT-I, ils ont montré une réduction de son activité et une altération de sa localisation intracellulaire ainsi qu'une réduction de la synthèse des chaînes de GAGs (Mis et al., 2014).

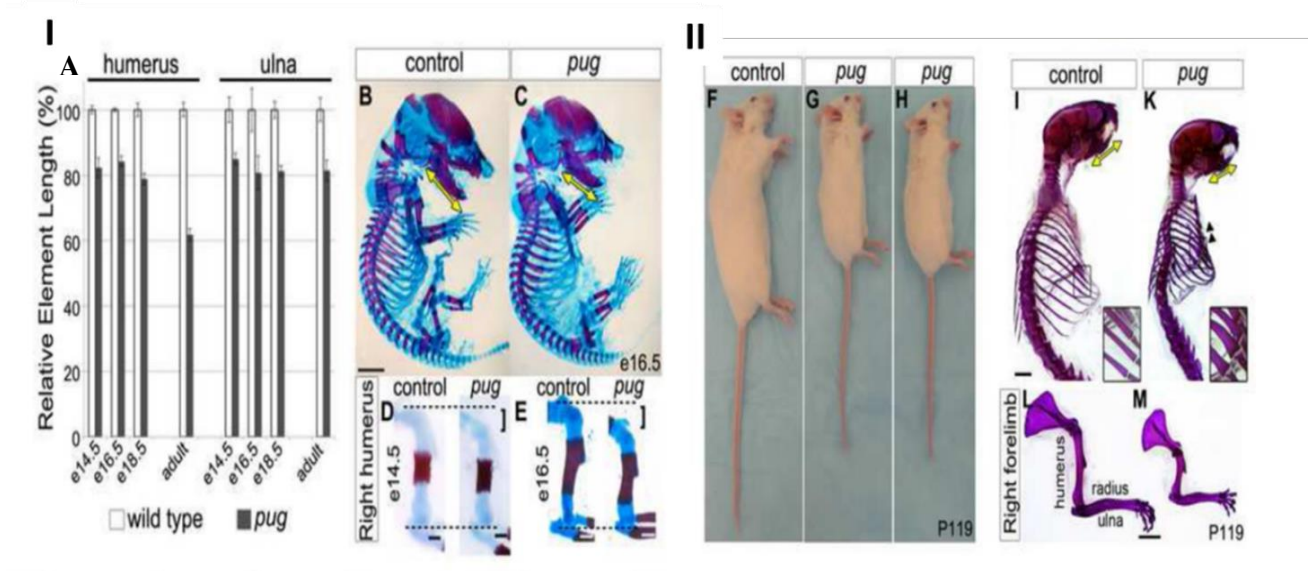


Figure 27 : Réduction de la taille des éléments squelettiques des souris pug. *I- Les embryons pug à différents âges présentent une réduction des membres supérieurs (A, D, E), une mandibule courte (B, C). II- Les souris postnatales présentent une réduction de la taille du corps (F, G, H), raccourcissement du crâne (I, K), raccourcissement des membres supérieurs (L, M) (Mis et al., 2014).*

Durant la même année, Bui et al. ont pu identifier cinq mutations chez sept patients qui souffrent du syndrome de Desbuquois dysplasia de type II (DBQD2). Cette étude clinique était la première à lier la mutation de la *XylTI* au syndrome DBQD2. D'une façon générale, la DBQD appartient au groupe des troubles de luxations multiples. Elle se caractérise par des luxations des grandes articulations, un retard de croissance pré et postnatale sévère, une laxité articulaire et une face plate avec des yeux proéminents. En raison de la présence ou de l'absence d'anomalies supplémentaires de la main, on peut distinguer DBQD du type I et du type II. Les mutations identifiées comprennent : une mutation faux-sens (c.1792C>T [p.R598C]) située dans le domaine catalytique de la XT-I et qui préserve une altération de la localisation intracellulaire de l'enzyme ; deux mutations générant un codon stop (c.276dG [p.P93Afs*69], c.439C>T [p.R147 *]) et par la suite une forme tronquée de l'enzyme ; les deux autres sont des mutations du site d'épissage (c.1290-2A> C, c.1588-3C>T) situées respectivement dans les introns 5 et 7. Ces mutations ont entraîné une diminution de la synthèse des GAGs (Bui et al., 2014). Les patients étudiés présentent des membres courts, un visage plat, un thorax étroit et une déficience intellectuelle (Figure 28).

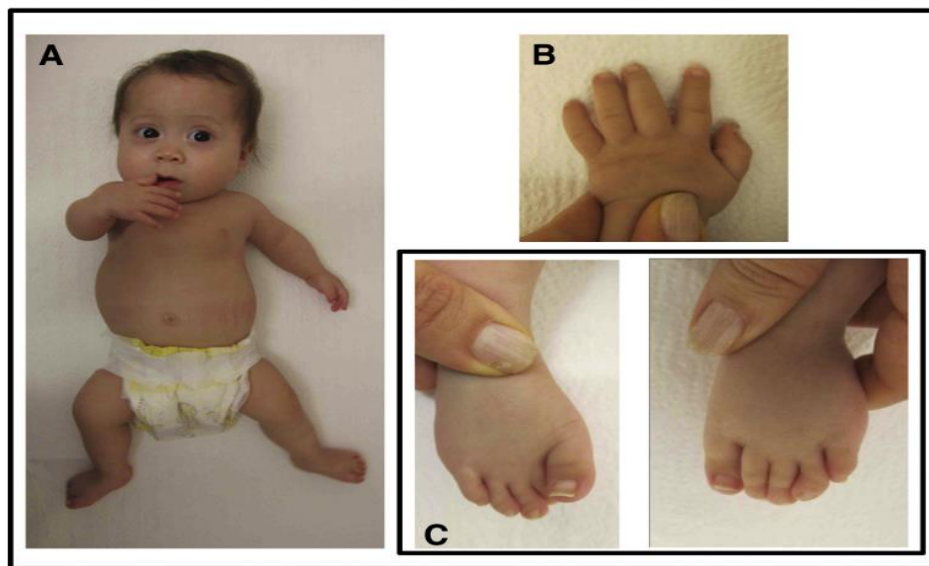


Figure 28 : Caractéristiques cliniques d'un patient atteint du Desbuquois dysplasia de type II (DBQD2) portant une mutation au niveau de la *XylTI* dans son génome. *A-* Visage plat, réduction des membres. *B-* Hyperlaxité des doigts. *C-* Déviation des orteils (Bui et al., 2014).

Depuis 2015 jusqu'en 2017, cinq nouvelles études ont été publiées sur des études cliniques réalisées sur des patients souffrant de DBQD II. Ces études ont rapporté sept nouvelles mutations de la *XylT1*. Les mutations identifiées comprennent une mutation faux-sens (c.1651C>T [p.R551C]) (Koningsbruggen et al., 2016) ; la première mutation hétérozygote (c.595C>T c.1651C>T, [p.Q199*, p.R551C]) où le patient a montré une déficience en GH et IGF-1 et une ostéoporose généralisée légère à modérée accompagnée d'autres anomalies squelettiques (Figure 29) (Jamsheer et al., 2016) ; une mutation faux-sens (c.1651C>T [p.R551C]) localisée au niveau d'une région essentielle pour l'activité de XT-I (Silveira et al., 2016), deux mutations non-sens qui ont abouti à un codon stop (c.1792delC [p.R598Afs*7], c.2169dupA [p.V724Sfs*10]) et par la suite une forme tronquée de l'enzyme (Guo et al., 2017 ; Al-Jezawi et al., 2017) et une mutation du site d'épissage (c.1290-2A>C) située entre l'intron 5 et l'exon 6 (Guo et al., 2017). La mutation (c.2169dupA) a montré une rétention de la XT-I dans le RE et une réduction de son activité (Al-Jezawi et al., 2017).

Le tableau 6 illustre les différentes mutations déjà citées.

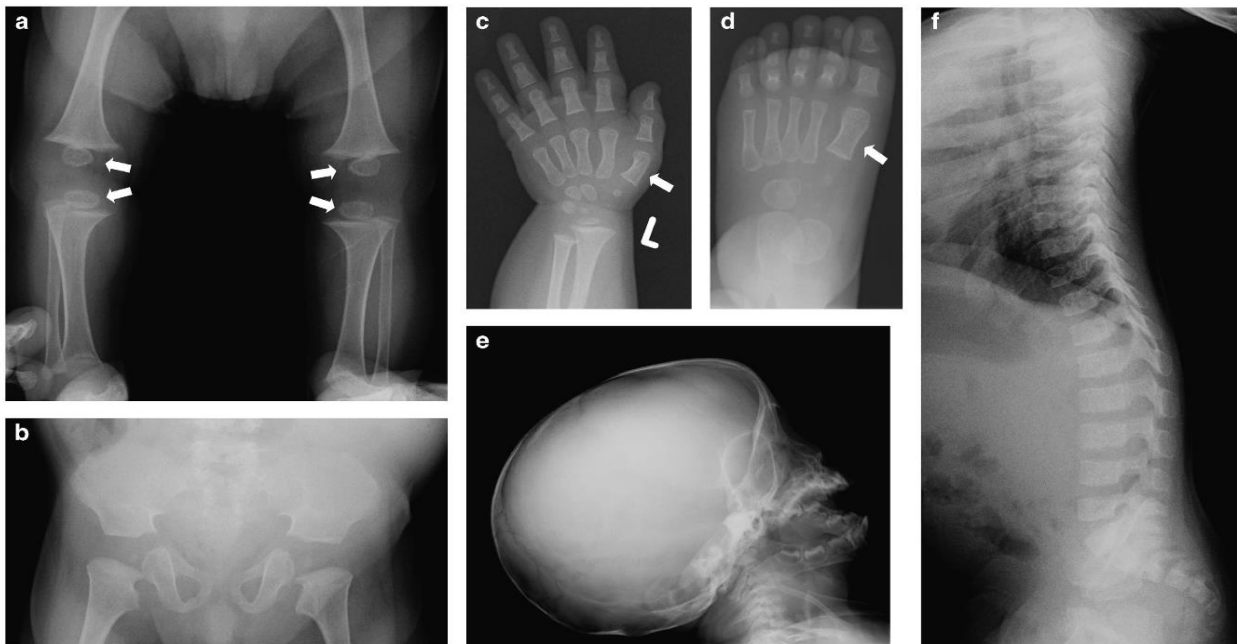


Figure 29 : Anomalies squelettiques d'un patient atteint du Desbuquois dysplasia de type II (DBQD2) portant une mutation au niveau de la *XylT1*, évaluées par Rayon-X. a- Des anomalies au niveau des os longs. b- Au niveau du bassin. c- Au niveau de la main gauche. d- Au niveau du pied gauche. e- Au niveau du crâne. f- Au niveau de la colonne vertébrale montrant des signes d'ostéoporose (Jamsheer et al., 2016).

Polymorphism	Amino acid	Location	No. of patients	Age (years)	Origin	Consanguinity	Effects on XT-I	References
c.1792C>T	p.R598C	Exon 9	2 siblings	24, 20	Tunisian	Yes	ER retention	Bui et al., 2014
c.439C>T	p.R147*	Exon 3	1	14	Mauritian	Yes	Decreased mRNA expression	Bui et al., 2014
c.276dupG	p.P93Afs*69	Exon 1	1	23	Belgian	Yes	Decreased mRNA expression	Bui et al., 2014
c.1588-3C>T	Exon skipping	Intron 7	1	5.5	Turkish	Yes		Bui et al., 2014
c.1290-2A>C	Exon skipping	Intron 7	1	13	Turkish	Yes		Bui et al., 2014
c.1290-2A>C	Exon skipping	Intron 5	1	1	Turkish	Yes		Bui et al., 2014
c.1441C>T	p.R481W	Exon 7	2 siblings	16, 18	Turkish	Yes	Loss of Golgi subcellular localization and functional alterations	Schreml et al., 2014
c.1651C>T	p.R551C	Exon 8	1	5 weeks	Dutch	No		van Koningsbruggen et al., 2016
Hete (c.595C>T, c.1651C>T)	p.Q199*, p.R551C	Exon 3	1	7	Polish	No		Jamsheer et al., 2016
c.1651C>T	p.R551C	Exon 8	1	11	Brazilian	Yes	Might disrupt the activity of XT-I	Silveira et al., 2016
c.1792delC	p.R598Afs*7	Exon 9	2 siblings	7, 40 days	Turkish	Yes		Guo et al., 2017
c.1290-2A>C		Intron 5	1	4 months	Turkish	No		Guo et al., 2017
Hete (c.1588-10_1595del, 3.3 Mb del)	0-allels	Intron 7	1 sibling, 3 stillbirths					Al-Jezawi et al., 2017
c.2169dupA	p.V724Sfs*10	Exon 10	1	1 month	Emarati	Yes	ER retention and decreased XT-I activity	Al-Jezawi et al., 2017

Tableau 6 : Les variants génétiques de la *XylTI* reportés chez les patients atteints du Desbuquois dysplasia de type II (DBQD2) ainsi que l'effet de certains variants sur l'activité et l'expression de la XT-I. dup : duplication ; Hete : hétérozygote ; del : délétion ; fs : frameshift ; p : protein.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Modèle animal

1. Les souches de souris

La génération de souris *XylT1^{fllox/flox}* (fond C75BL/6) et *Col2a1-CreERTM* (fond BALB/c) a été réalisée par l'« Institut Clinique De La Souris ». Le croisement entre les souris a été réalisé dans notre laboratoire, jusqu'à l'obtention des souris *Col2a1-CreERTM;XylT1^{fllox/flox}*.

2. Génotypage des souris *Col2a1-CreERTM;XylT1^{fllox/flox}*

La présence ou l'absence de *Cre* et *XylT1^{fllox/flox}* (281Kb) a été déterminée en utilisant des amorces de PCR spécifiques à chacun de ces gènes. Le tableau ci-dessous représente les différentes amorces utilisées lors de cette étape de croisement. Le génotypage des descendants a été effectué par PCR sur l'ADN génomique de queue, isolé par Direct PCR Lysis Reagent (VIAGEN Biotech, Los Angel) puis digéré par la protéinase K (Sigma, France) pendant une nuit à 55 ° C, et amplifié par PCR; 35 cycles de dénaturation à 94 ° C pendant 30 secondes, hybridation à 55 ° C pour *Cre* et 62 ° C pour *XylT1* pendant 30 secondes, et polymérisation pendant 90 secondes à 72 ° C dans un tampon de réaction contenant 1,5 mM de MgCl₂, 1 x tampon PCR (Quiagen, Allemagne, PCR HotStarTaq Plus Master Mix Kit). Les produits d'amplification ont été migrés sur un gel d'agarose 2% (Sigma, France) pour le génotypage des souris *XylT1^{fllox/flox}* ou nommées *XylT1-cKO* et un gel 3% d'agarose pour celui des souris *Col2a1-CreERTM*. Le tableau ci-dessous représente les différentes amorces utilisées dans le génotypage des souris.

Nom de l'amorce	Séquences
LF	5'- ATC CCT AAG ATG TGT TTT CCA GTC ACC AT -3'
LR	5'- GAG TTA GTT AAC CAG TGG GCT TGA GGT G -3'
LXR	5'- CGA AGT TAT CTG CAG GTC GAC CTT AAG -3'
CreF	5'- GCG GTC TGG CAG TAA AAA CTA TC -3'
CreR	5'- GTG AAA CAG CAT TGC TGT CAC TT -3'

Tableau 7 : Les séquences d'amorces utilisées dans le génotypage des souris : *Col2a1-CreERTM*, *XylT1-cKO* et *Col2a1-CreERTM/XylT1-cKO*. *LF* : *XylT1* forward primer ; *LR* : *XylT1* reverse primer ; *LXR* : *LoxP* reverse primer ; *CreF* : *Cre* recombinase forward primer ; *CreR* : *Cre* recombinase reverse primer.

3. Soins et élevage des souris

Les procédures de soins et de mise à mort des animaux sont conformes à la réglementation et les expériences sur les animaux ont été approuvées par les comités d'éthique locaux et le Ministre de l'Enseignement et de la Recherche. Au cours de l'acclimatation et des expérimentations, les animaux sont stabulés et élevés dans l'animalerie au sein de notre laboratoire dans des conditions standards contrôlées de température ($23 \pm 2^\circ \text{C}$), de lumière (cycle 12h d'obscurité 12h lumière), d'humidité ($55\% \pm 10\%$) avec un accès libre à l'eau et aux aliments. Pour toutes les procédures suivantes, les souris adultes ont été mises à mort par inhalation de CO_2 dans une chambre appropriée (Minerva) alors que les souris nouveau-nées sont mises à mort par dislocation cervicale.

4. Injection du tamoxifène (TM)

Afin d'activer ce système et invalider le gène cible *Xyl/11*, le tamoxifène (TM) (Sigma, France) a été administré à $100 \mu\text{g/g}$ de poids corporel par voie intrapéritonéale. Pour permettre la solubilisation rapide de ce composant, il est dans un premier temps dissout à une concentration de 100 mg/ml dans de l'éthanol à 100% sous agitation pendant trois heures à 55°C puis conservé à -20°C . Par la suite, le tamoxifène est dilué dans de l'huile de maïs (Sigma, France) à une concentration de $100 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ et protégé de la lumière. Les solutions de TM ont été fraîchement préparées avant chaque injection. Les animaux ont reçu une injection du tamoxifène (cKO), ou du produit de solubilisation à base d'huile de maïs (WT), à l'âge d'une semaine puis trois autres injections à deux semaines d'intervalles. Les souris ont été mises à mort à l'âge de 4 et 8 semaines.

Une autre série d'expérience a été menée sur les souris âgées de 10 jours. Pour cela ces souris ont reçu cinq injections successives de TM durant la première semaine de vie, puis sont mises à mort à l'âge de 10 jours par dislocation cervicale.

5. Morphométrie des souris

A partir de la première injection de tamoxifène et jusqu'à 8 semaines, nous avons comparé le poids et la longueur du fémur de souris injectées ou non avec du tamoxifène et réalisé des courbes de croissance de ces mêmes souris. Pour ce faire, les souris ont été tatouées lors de l'injection, puis pesées chaque semaine avec une balance de précision ($0,1\text{g}$). Leur longueur a été mesurée, du nez à la base de la queue avec un pied à coulisse (Digital Electronic Caliper). Les souris âgées de 8 semaines ont été mises à mort et les

fémurs et tibias ont été prélevés et mesurés avec le pied à coulisse. Afin de limiter les erreurs, nous avons comparé ces paramètres chez des souris issues de portées de taille similaire.

6. Double coloration au Bleu Alcian (BA) et au Rouge Alizarine (RA) du squelette entier des souris âgées de 4 semaines

L'étude des tissus cartilagineux et osseux a été réalisée sur le squelette entier des souris par double coloration au bleu Alcian et au rouge Alizarine. Le bleu Alcian est un colorant qui permet de mettre en évidence en bleu le cartilage en se fixant sur les chaînes de GAGs. Il est utilisé en parallèle du rouge Alizarine qui colore les os en rouge en se fixant sur les dépôts de calcium dans les tissus minéralisés. Les souris postnatales âgées de 4 semaines ont été mises à mort, écorchées et éviscérées à l'exception de la trachée. Les squelettes ont ensuite été fixés dans de l'éthanol à 95% pendant au moins 2 jours. Les squelettes entiers sont incubés dans une solution de bleu Alcian 8GX (BA, Sigma, France) (BA 0,015%, 80% EtOH à 96% et acide acétique à 20%) pendant toute la nuit. Les squelettes sont ensuite traités par une solution d'EtOH 95% pendant 3 puis une solution de KOH à 2% jusqu'à élimination des tissus. Les échantillons sont alors transférés dans une solution de rouge Alizarin (RA, Sigma) (0,01% dans KOH 1%) jusqu'à développement d'une coloration sombre des os squelettiques. La coloration est arrêtée par traitement par une solution à 1% de KOH-20% de glycérol sous agitation. Les échantillons sont stockés après traitement par des solutions de glycérol / éthanol (50/50, 80/20) et photographiés dans une solution à 100% de glycérol.

7. Etude structurale des tissus osseux par la microtomographie à rayon X à haute résolution (High-Resolution Micro Computer Tomography : μ CT)

Les fémurs de souris *Col2a1-CreERTM/XylT1-cKO* sauvages (WT) et mutées (cKO) âgées de 8 semaines ont été scannés avec un μ CT à haute résolution chez RMES - "Regenerative Medicine and Skeleton" "UFR d'Odontologie de Nantes". Brièvement, les animaux adultes (8 semaines) ont été mis à mort et les fémurs ont été isolés, dépouillés de tissus mous, fixés dans du formaline 4% et stockés dans de l'éthanol 70% à 4 ° C. Les os ont été scannés en utilisant SKYSCAN 1272. Les données ont été acquises à 70 kV avec une résolution cubique de 7 μ m. Les reconstructions tridimensionnelles ont été générées avec les paramètres suivants : Smoothing: 0 ; Ring Artifact Correction : 2 ; Beam Hardening Correction: 35%; Minimum (Absorption coefficient): 0; Maximum (Absorption coefficient) : 0,14. Les données μ CT à 2 et 3 D comprenaient le volume osseux par rapport à la fraction volumique totale (BV/TV), l'épaisseur trabéculaire (Tb.Th), le nombre de trabécules (Tb.N), la séparation trabéculaire (Tb.Sp), le facteur

trabéculaire (Tb.Pf), l'épaisseur corticale Ep (CT.Th), la densité osseuse, la densité minérale tissulaire (TMD), la densité osseuse trabéculaire (BMD) et l'indice du modèle de structure (SMI) ont été quantifiés.

8. Etude histologique des tissus cartilagineux et osseux des membres inférieurs des souris *Col2a1-CreERTM;XylT1^{flox/flox}*

8.1. Dissection des genoux et des membres inférieurs

Les genoux et les membres inférieurs des souris à différents âges (10 jours, 4 et 8 semaines) sont recueillis rapidement après la mise à mort des animaux. Ils sont fixés dans une solution de formaline tamponnée 4% pendant 24h à température ambiante. Les échantillons sont ensuite décalcifiés dans une solution d'EDTA 10% (Sigma, France) préparé dans du PBS, pH 7,6 à 4°C pendant 2 à 3 semaines selon l'âge des souris. Les échantillons sont déshydratés par des procédures de routine dans plusieurs bains d'alcool (Leica ASP 300S) et inclus dans de la paraffine. Les blocs sont sectionnés avec un microtome rotatif manuel (Leica RM 2135) et les sections de 5µm d'épaisseur sont positionnées sur des lames de verre Superfrost et Superfrost + (Fisher, Allemagne). Les images ont été prises avec un Leica DMD 108.

8.2. Coloration Tartrate Resistant Acid Phosphate (TRAP) sur des coupes histologiques

Afin de détecter les ostéoclastes dans les tissus osseux des animaux, une coloration TRAP à l'aide du kit Acid Phosphatase, Leukocyte (TRAP) (Sigma Aldrich, France) a été réalisée. Brièvement, les coupes de genou de souris âgées 8 semaines sont déparaffinées et réhydratées dans des bains d'alcool. Ensuite, les coupes sont placées dans une solution de coloration de TRAP préchauffée à 37°C et incubées à 37°C pendant 30 min. Une fois la coloration développée, les lames sont lavées 2 fois avec de l'eau distillée, puis contre-colorées dans une solution de 0,02% Fast Green (Sigma, France) pendant 1 min, lavées, déshydratées dans des bains d'alcool et montées. Les images de coloration ont été obtenues en utilisant un microscope Leica DMD 108.

8.3. Coloration des coupes histologiques des genoux

Afin de faciliter la lecture des lames, de mieux visualiser la morphologie cellulaire et de mettre en évidence le contenu en GAGs et en collagènes, plusieurs colorations ont été réalisées sur les coupes histologiques des genoux des animaux grâce à une machine de coloration (SAKURA). Toutes les colorations débutent par des étapes de déparaffinage et de réhydratation par des bains d'alcool successifs de 100% jusqu'à 70% et s'achèvent par des étapes de déshydratation dans des bains d'alcool successifs croissants d'alcool 70% jusqu'à 100%.

8.3.1. Bleu Alcian

La coloration bleu Alcian (pH 1,5) est une coloration spécifique des chaînes de GAGs sulfatées qui seront colorées en bleu. La contre-coloration qui a été utilisée lors de cette coloration est le Kernechtrot qui visualise les noyaux cellulaires. Brièvement, après les étapes de déparaffinage et de réhydratation, les coupes sont plongées dans la solution de bleu Alcian (0.001%, 3% acide acétique) pendant 2 h, puis lavées et plongées dans la solution de Kernechtrot (0.001%, 0.5% sulfate d'aluminium) pendant 5 min pour finir par les étapes de déshydratation. Les lames sont finalement montées dans le Pertex®.

8.3.2. Safranine-O

La safranine-O colore également les chaînes de GAGs et les mucines en rouge. Le Fast Green est utilisé comme contre-coloration visualisant le tissu osseux en vert bleuté. Brièvement, après les étapes de déparaffinage et de réhydratation, les coupes sont plongées dans une solution 0,03% Fast Green pendant 5 min, puis plongées dans une solution de 1% acide acétique pendant 20 s, lavées à l'eau et plongées dans une solution de 0,1% safranine-O (pH 5,3) pendant 5 min, pour finir par les étapes de déshydratation et le montage en utilisant le Pertex®.

8.3.3. Hématoxyline/Eosine/Safran

La coloration trichromatique d'Hématoxyline, Eosine et Safran (HES) est obtenue par l'ajout d'une étape de coloration avec le safran dans la procédure de coloration HE afin de colorer en jaune les fibres de collagène des tissus conjonctifs. Elle est la coloration la plus couramment utilisée en histologie. Cette méthode facilite la lecture des lames. Brièvement, après les étapes de déparaffinage et de réhydratation, les coupes sont plongées dans une solution d'hématoxyline (Harry's hematoxylin) pendant 5 min, suivie par un lavage avec l'eau, puis plongées dans une solution d'alcool ammoniacal (0.03%, 95% éthanol) pendant 1 min, lavées, plongées dans une solution d'éosine (0.01% dans l'eau distillée), pour finir par les étapes de déshydratation et du montage en utilisant le Pertex®.

8.3.4. Rouge Sirius

La quatrième coloration utilisée est le rouge Sirius qui est un colorant acide hydrophile qui teinte en rouge les fibres de collagènes. L'organisation du collagène va déterminer la concentration locale des molécules de rouge Sirius qui vont s'aligner sur les fibrilles du collagène. Brièvement, après les étapes de déparaffinage et de réhydratation, les coupes sont plongées dans une solution de rouge Sirius (0.1%, acide picrique, Sigma-Aldrich) pendant 1h, suivie d'une solution de HCl 0,01 N pour finir par les étapes de déshydratation et du montage en utilisant le Pertex®.

Les images de coloration ont été obtenues en utilisant un microscope Leica DMD 108.

8.4. La microscopie de génération de second harmonique (GSH)

Le GSH est une technique d'imagerie efficace dans la visualisation des macrostructures denses et ordonnées telle que les fibres de collagènes de la MEC. Il s'agit d'un processus dans lequel deux photons de même fréquence interagissent avec un matériau non linéaire, sont "combinés" et génèrent un nouveau photon avec deux fois l'énergie des photons initiaux. La visualisation des fibres de collagènes au niveau de la plaque de croissance est réalisée par cette technique sur des coupes histologiques de tibia de souris sauvages et mutées âgées de 8 semaines. Brièvement, les blocs de tibias sont sectionnés à 10 µm d'épaisseur avec le microtome. Ensuite, les sections sont déparaffinées, réhydratées puis déshydratées et montées en utilisant le Pertex®. Une fois séchées, les sections sont analysées par la technique GSH.

8.5. Hybridation In Situ par RNAscope (HIS)

L'HIS non radioactive par RNAscope a été réalisée sur des coupes longitudinales ou transversales de paraffine de 5 µm d'épaisseur de spécimens de genou de souris montés sur des lames de verre Superfrost + (Fisher). L'hybridation de l'ARN in situ sur les coupes de l'articulation du genou de la souris a été réalisée comme décrit précédemment (Wang et al., 2012) avec quelques modifications. Brièvement, des coupes de tissu de 5 µm sont déparaffinées à 60 ° C, puis dans du xylène, suivi par une déshydratation dans une série de bains d'éthanol. Les coupes tissulaires sont ensuite incubées dans du tampon citrate (10 nmol / L, pH 6) à 96 ° C pendant 15 minutes, rincées dans du tampon de lavage et immédiatement traitées avec 10 g/mL de protéase (ACD) à 40 ° C pendant 30 minutes dans un four d'hybridation HybEZ (ACD, Hayward, CA). L'hybridation avec des sondes cibles, un préamplificateur, un amplificateur et une sonde à marqueur et une détection chromogénique ont été réalisées en utilisant du DAB suivi d'une contre-coloration avec l'hématoxyline, déshydratation et montage (Figure 30). Ici, nous avons utilisé des sondes murines dirigées contre : le *Col10a1*, le *β-glap*, le *Spp1*, le *Col2a1*, l'*Acan*, l'*Ihh* (ACD, USA). Des images d'hybridation d'ARN ont été obtenues en utilisant un microscope Leica DMD 108.

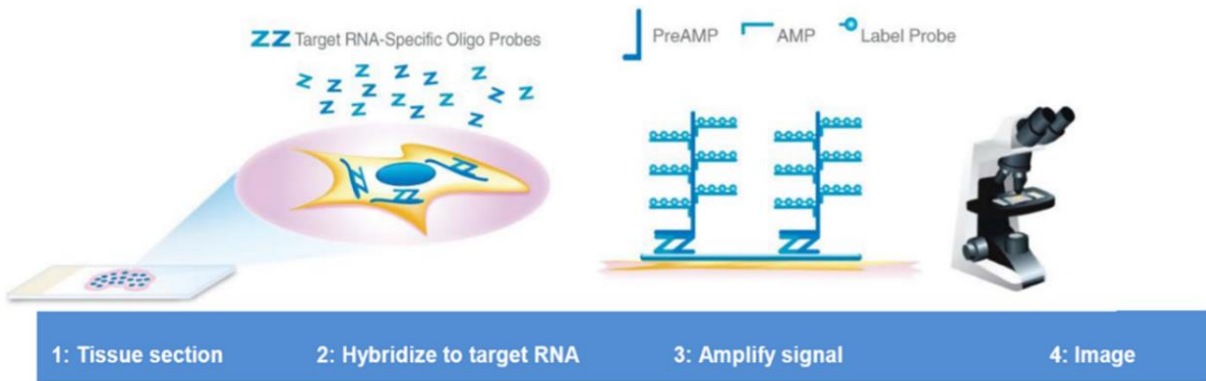


Figure 30 : Vue générale du déroulement de l'hybridation In Situ en utilisant la technique de RNAscope de chez ACD. 1 : préparation des sections et prétraitement pour faciliter l'accessibilité aux ARNm cibles. 2 : 20 paires de sondes s'hybrident d'une façon spécifique à l'ARNm cible. 3 : Ces sondes s'hybrident à une cascade de molécules amplificateurs (préamplificateurs et amplificateurs) liées à la HRP, suivie d'une détection de signal par une solution de DAB. 4 : visualisation par microscopie optique (RNAscope 2.5 HD Detection Kit (Brown) User Manual).

8.6. Immunohistochimie (IHC)

L'IHC a été réalisée sur des coupes préparées à partir d'articulations de genoux de souris âgées de 10 jours en utilisant le kit Dako Envision. Brièvement, les coupes incluses dans la paraffine sont déparaffinées dans des bains d'alcool, puis lavées deux fois avec du PBS, suivi par un traitement au citrate pendant une nuit à 55 ° C. Par la suite, les sections sont bloquées, incubées avec des anticorps primaires et secondaires, contre colorées par l'hématoxyline, déshydratées dans des bains d'alcool (70%, 95%, 100%) puis xylène et montées. Les anticorps primaires et les dilutions utilisées sont : MMP13 (Abcam, UK, 1/150), TGFβ2 (Gene Tex, USA, 1/500), TGFβ3 (Santa Cruz, CA, USA, 1/200), Wnt4 (Santa Cruz, CA, USA, 1/500) et Wnt5b (Gene Tex, USA, 1/100). Les images d'immunohistochimie ont été obtenues en utilisant un microscope Leica DMD 108.

8.7. Injection intrapéritonéale de l'inhibiteur de TGFβ1

L'inhibiteur de TGFβ1 (LY364947, Stress Marq) a été repris dans du DMSO pour faciliter sa solubilisation. Il a été injecté chez les souris par voie intrapéritonéale à une dose de 0,5 mg/kg. Ces injections ont été faites couplées aux injections de tamoxifène ; une injection à l'âge d'1 semaine, puis 3 autres injections à intervalle de 2 semaines, jusqu'à mise à mort des souris âgées 8 semaines. Afin de

savoir l'effet de cette molécule sur les animaux, les souris *Col2a1-CreERTM;XylTI^{flox/flox}* ont été séparées en quatre groupes : le premier groupe a servi de contrôle et a reçu de l'huile de maïs et du DMSO ; le deuxième groupe a reçu des injections de l'huile de maïs parallèlement à une dose d'inhibiteur de TGF β R1 ; le troisième a reçu des injections de tamoxifène et du DMSO, et le quatrième a reçu des injections de tamoxifène parallèlement aux injections de l'inhibiteur de TGF β R1. Un suivi hebdomadaire du poids, de la taille et du comportement a été réalisé. A l'âge de 8 semaines, la longueur des souris a été mesurée, du nez jusqu'à la base de la queue avec un pied à coulisse (Digital Electronic Caliper).

Modèle cellulaire

1. Etude des ostéoblastes dérivés des os longs des souris *Col2a1-*

CreERTM;XylTI^{flox/flox}

1.1. Culture des ostéoblastes dérivés des os longs des souris WT et cKO âgées de 6 semaines

Afin d'étudier l'influence de la délétion de la *XylTI* sur la formation osseuse et surtout les ostéoblastes, on a cultivé ces ostéoblastes dérivés des os longs des souris WT et cKO âgées de 6 semaines selon le protocole suivant. Les os longs ont été disséqués, bien nettoyés, et lavés avec du PBS (1X) stérile. La partie cartilagineuse des deux extrémités osseuses a été coupée. Ensuite la partie osseuse restante (la diaphyse) a été coupée en des petits morceaux avec une lame de scalpel. Ces portions osseuses ont été lavées 3 fois avec du PBS et incubées dans une solution de collagénase D (2 mg/ml, Roche Diagnostic, Germany) préparée dans un milieu α MEM (Lonza) supplémenté par 2 mM glutamine et 100 U/ml pénicilline/ streptomycine, pendant 2 h à 37°C, 5% CO₂ sous atmosphère humide. Toutes les 30 min, la solution contenant les portions osseuses a été agitée. Après 2 h d'incubation, ces morceaux ont été lavés 3 fois avec le milieu de culture (α MEM, supplémenté par 1% glutamine et 1% pénicilline/ streptomycine et 10% SVF), puis transférés dans des flasques 25 cm² contenant 5 ml de milieu de culture. Après chaque changement de milieu, il est nécessaire de vérifier que les morceaux sont bien distribués. La migration des ostéoblastes commence après 3 à 5 jours d'incubation.

1.2. Extraction des protéines cellulaires

Les cellules sont rincées trois fois par le PBS puis récoltées dans le tampon de lyse contenant 25 mM Tris HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl, 1% déoxycholate de sodium, 0,1% SDS et des inhibiteurs de phosphatases et des protéases. Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 10 min à 14000 x g et à 4°C suivie de 3 sonications de 10 s chacune réalisées dans la glace. Le lysat est centrifugé à 10000 x g pendant 10 min à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires. Finalement, les protéines sont dosées selon la méthode de Bradford et stockées à -80°C jusqu'à utilisation.

1.3. Western blot

L'analyse de l'expression protéique est évaluée par la méthode de migration SDS-PAGE suivie d'un électrotransfert des protéines sur membrane et révélation par Chimiluminescence. Brièvement, les protéines extraites à partir des cellules sont diluées dans le tampon du Laemmli (125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 4% (p/v) SDS, 20% s(v/v) glycérol, 10% (p/v) β -mercaptoéthanol, 0,004% (p/v) bleu de bromophénol), dénaturées pendant 5 min à 95 ° C, puis déposées sur gel de polyacrylamide. Les

échantillons sont migrés dans une cuve de migration (Bio-Rad, France) sous un ampérage constant de 20 mA. Les échantillons protéiques sont ensuite transférés sur une membrane Immun-Blot®PVDF Membranes for Protein Blotting (Bio-Rad) par un transfert rapide dans la machine d'électrotransfert Trans-Blot® Turbo™ Transfert System (Bio-Rad, France) sous un voltage constant de 25V et pendant 10 min. Après transfert, la membrane est saturée dans une solution de lait écrémé à 5% déjà préparée dans un tampon du TBST (*Tris Buffer Saline Tween* : 150 mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 mM NaCl, 0,5% (v/v) Tween 20, 0,02% (p/v) azide de sodium) pendant 1 h, lavé au TBST 1X, puis mise au contact avec l'anticorps spécifique (Anti-β-caténine, 1/1000, Anti-β-actine, 1/4000, Cell Signaling et Anti-pERK, 1/2000, Cell signaling). Après plusieurs rinçages au TBST, la membrane est ensuite incubée avec une solution contenant un second anticorps couplé à la peroxydase. La révélation se fait par Chimiluminescence grâce à Clarity Max™ Western ECL Blotting Substrates (Bio-Rad, Hercules, CA).

1.4. Extraction des ARNm totaux à partir des ostéoblastes en culture

L'ARN total des cellules a été extrait directement par le kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Germany). Le tampon RLT a été utilisé pour lyser les cellules. Les échantillons ont ensuite été appliqués aux colonnes de centrifugation RNeasy Mini. Après lavage avec 700 µl de tampon RW1 et deux lavages avec 500 µl de tampon RPE, l'ARN total a été élué avec 30 µl d'eau RNase-free. La concentration d'ARN a été mesurée par Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA). Le rapport de l'absorbance à 260 nm et 280 nm est utilisé pour évaluer la pureté de l'ARN (un rapport de ~ 2,0 est généralement accepté comme ARN pur).

1.5. La transcription inverse

La transcription inverse a été réalisée en utilisant 500 ng ou 1 µg d'ARN total avec l'iScript™ Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad). Les quantités indiquées d'ARN et 4 µl de Master Mix ont été complétées par de l'eau RNase-free jusqu'à un volume final de 20 µl. La solution a été doucement mélangée et incubée à 25 ° C pendant 5 minutes, à 42 ° C pendant 30 minutes et finalement à 85 ° C à 5 minutes. L'ADNc a été stocké à -20 ° C.

1.6. La PCR quantitative relative en temps réel (qPCR)

La PCR quantitative a été réalisée avec iTaq™ Universal SYBER Green Supermix kit (BIO-RAD, Hercules, CA) utilisant les systèmes de PCR en temps réel Step One Plus™ (Applied Biosystems). Les paramètres d'amplification étaient de 30 s à 95 ° C ; 40 cycles de 15 s à 95 ° C et 1 min à 60 ° C. La courbe de fusion a été utilisée pour examiner la spécificité des amplifications de PCR. L'expression des gènes a

été déterminée en deux exemplaires dans trois expériences distinctes et normalisée avec différents gènes de ménage, la protéine ribosomale, le gène de glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et le S29. Les analyses et les différences d'expression (fold) entre les souris WT et XT-I/KO ont été déterminées en utilisant la formule $2^{-\Delta\Delta CT}$, et les données sont relatives aux valeurs de contrôle (WT). Le changement d'expression a été calculé à partir des valeurs de $\Delta\Delta CT$. Les séquences d'amorces sont répertoriées dans le tableau 8.

2. Tests statistiques

Les différences entre les groupes expérimentaux ont été évaluées en utilisant le *t-test* et le test *ANOVA*. Toutes les données sont indiquées en tant que moyennes \pm S.E.M. avec une signification statistique définie comme $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) ou $p < 0,001$ (***) . Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant GraphPad PRISM (v6). Toutes les valeurs sont représentées par la moyenne \pm SEM.

Nom de l'amorce	Séquences
OPN -F	5'- CCC GGT GAA AGT GAC TGA TTC - 3'
OPN-R	5'- ATG GCTTTC ATT GGA ATT GC - 3'
COL1-F	5'- CAC CCT CAA GAG CCT GAG TC - 3'
COL1-R	5'- TTA GGC GCA GGA AGG TCA GC - 3'
OSX-F	5'- ATG GCG TCC TCT TCT GCT TG - 3'
OSX-R	5'- AAG GTC AGC GTA TGG CTT CT - 3'
S29-F	5'- GAA GTT CGG CCA GGG TTC - 3'
S29-R	5'- TCC AAC TTA ATG AAG CCT ATG TCC - 3'
GAPDH-F	5'- ATC CCA TCA CCA TCT TCC AG - 3'
GAPDH-R	5'- GCC ATC ACG CCA CAG TTT CC - 3'
DMP1-F	5'- TTC GAG AAC TTC GCT GAG GT - 3'
DMP1-R	5'- TTG TGG TAT CTG GCA ACT GG - 3'
MEPE-F	5'- CCC CAA GAG CAG CAA AGG TA - 3'
MEPE-R	5'- CTC CGC TGT GAC ATC CCT TTA - 3'

Tableau 8 : Tableau représentant les différentes séquences des amorces utilisées dans la RT-qPCR

F : Forward ; R : reverse

OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Objectifs de l'étude

Les protéoglycanes (PGs) sont des macromolécules complexes contenant une protéine core sur laquelle sont fixés des chaînes de glycosaminoglycanes (GAGs). Les PGs revêtent une importance considérable en raison de leur double rôle dans l'organisation de la matrice extracellulaire et dans les mécanismes de régulation liés à leurs capacités d'interaction avec les facteurs de croissance et les cytokines. C'est ainsi qu'ils régulent la biodisponibilité de ces facteurs et par conséquent jouent un rôle essentiel dans la régulation de plusieurs processus biologiques tels que la prolifération, la migration cellulaire, les interactions cellule-cellule et cellule-matrice. Il est important de noter que des perturbations de synthèse des PGs sont associées à un grand nombre de pathologies dont le cancer, l'arthrose, la fibrose, le diabète et l'Alzheimer ainsi qu'aux anomalies du développement squelettique tel que la chondrodysplasie.

La xylosyltransférase I (XT-I) est l'enzyme qui initie la biosynthèse des chaînes de GAGs des PGs en catalysant le transfert d'un sucre xylose sur un résidu sérine de la protéine core. De ce fait, elle joue un rôle clé dans la régulation de la biosynthèse des PGs. L'implication de la XT-I dans de nombreuses pathologies a été reportée. Récemment, la mutation de la XT-I a été révélée chez des sujets atteints du syndrome de Desbuquois dysplasie (Desbuquois dysplasia type 2 : DBQD2) qui est une ostéochondrodysplasie caractérisée par des luxations de grandes articulations, un retard de croissance pré et postnatale sévère, une laxité articulaire et une face plate avec des yeux proéminents.

L'objectif du travail de thèse porte sur l'étude du rôle physiologique et physiopathologique de la XT-I dans le développement ostéoarticulaire.

Les objectifs spécifiques sont :

- 1) Développement d'une souris **Knockout conditionnelle** pour le gène de la $XylTI^{lox/lox}$. Cette approche nous permettra d'invalider le gène de la XT-I de façon spatiotemporelle.
- 2) Développement de souris $Col2a1-CreER^{TM};XylTI^{lox/lox}$ permettant l'inactivation spécifique de la XT-I au niveau du cartilage après injection du tamoxifène.
- 3) Etude du phénotype des souris déficientes en XT-I à différents âges.
- 4) Exploration des différents paramètres histomorphométriques osseux afin de déterminer d'éventuelles anomalies structurales.
- 5) Etude histologique de la plaque de croissance et du cartilage articulaire : analyse de la morphologie cellulaire, de l'épaisseur des différentes zones de la plaque de croissance, de la MEC et son

contenue en GAGs et en collagène et exploration des marqueurs de la chondrogenèse et de l'ostéogenèse.

- 6) Analyse des mécanismes et des facteurs à l'origine d'éventuelles anomalies du développement.
- 7) Etude de l'effet de l'inactivation de la XT-I sur l'activité des ostéoblastes *in vitro*.

RÉSULTATS

*Impact de l'invalidation de la xylosyltransférase I
au niveau des chondrocytes, sur le processus
d'ossification endochondrale, la maturation des
chondrocytes et l'ostéogénèse dans un modèle de
souris postnatales*

1. Génération de la lignée *Col2a1-CreERTM;XylTI^{flox/flox}*

1.1. Présentation de la lignée *XylTI^{flox/flox}*

Le gène codant la xylosyltransférase I (Gene ID : ENSMUSG00000030657) est localisé sur le chromosome 7 et est constitué de 12 exons d'une taille de 312 kb. Il existe trois transcrits différents de ce gène, un transcrit (Gene ID : ENSMUST00000032892) de 3191 pb qui code pour une protéine de 953 d'acide aminés, et deux autres transcrits ne produisant pas de protéines.

Afin d'invalider ce gène, une stratégie de délétion bien définie a été réalisée chez les souris C75BL/6. L'insertion des séquences *LoxP* est réalisée au niveau des deux extrémités de l'exon 5 du gène qui sera excisé en présence de la Cre recombinase (Figure 31). Cette dernière va aboutir à l'expression d'une protéine de 358 acides aminés non active si l'ARNm correspondant est stable.

Dans le but de vérifier la présence des sites *LoxP* au niveau des extrémités de l'exon 5 et de déterminer l'état allélique du gène *XylTI*, l'ADN génomique est extrait à partir de la queue des souris. Deux réactions de PCR sont réalisées afin de cribler les souris transgéniques. La première réaction est réalisée avec les amorces LF et LR qui permettent l'amplification d'un produit de 300 pb en cas de présence des sites *LoxP* et de 220 pb en cas d'absence de ces sites. La deuxième réaction consiste en l'utilisation des amorces LF et LXR dont LXR s'hybride spécifiquement sur le site *LoxP*. L'amplification d'une séquence de 209 pb atteste de la présence du site *LoxP*, alors que l'absence d'amplification indique l'absence de ce site. Si les souris sont homozygotes et floxées au niveau de l'exon 5 du gène *XylTI*, l'amplification de deux produits de 300 et 209 pb est observée. Dans le cas des souris homozygotes sauvages, l'amplification d'un seul produit de 220 pb est obtenu. Alors que les souris hétérozygotes montrent une amplification de 3 produits de 220 pb, 300 pb et 209 pb (Figure 32 B, C).

1.2. Présentation de la lignée *Col2a1-CreERTM*

Les souris *Col2a1-CreERTM* expriment la Cre (enzyme de recombinaison) sous le contrôle du promoteur du gène de collagène de type II (*Col2a1*) de façon spécifique dans les chondrocytes. Ces souris ont été obtenues de JACKSON, elles expriment une forme modifiée de Cre (*CreERTM*) dans laquelle la recombinase est fusionnée à un domaine de liaison du ligand du récepteur à l'œstrogène muté (*ERTM*) qui permet son activation par le Tamoxifène exogène (Figure 31). Dans le but de vérifier la présence du gène *Cre* chez les souris *Col2a1-CreERTM;XylTI^{flox/flox}*, nous avons réalisé des réactions de PCR permettant de

mettre en évidence la présence ou non de la séquence de la *Cre* au niveau de l'ADN génomique des souris obtenues après croisement des *Col2a1-CreERTM* et des *XylT1^{lox/lox}*. L'amplification d'un produit de 100 pb caractérise les souris transgéniques portant le gène *Cre* dans leur génome (Figure 32 A).

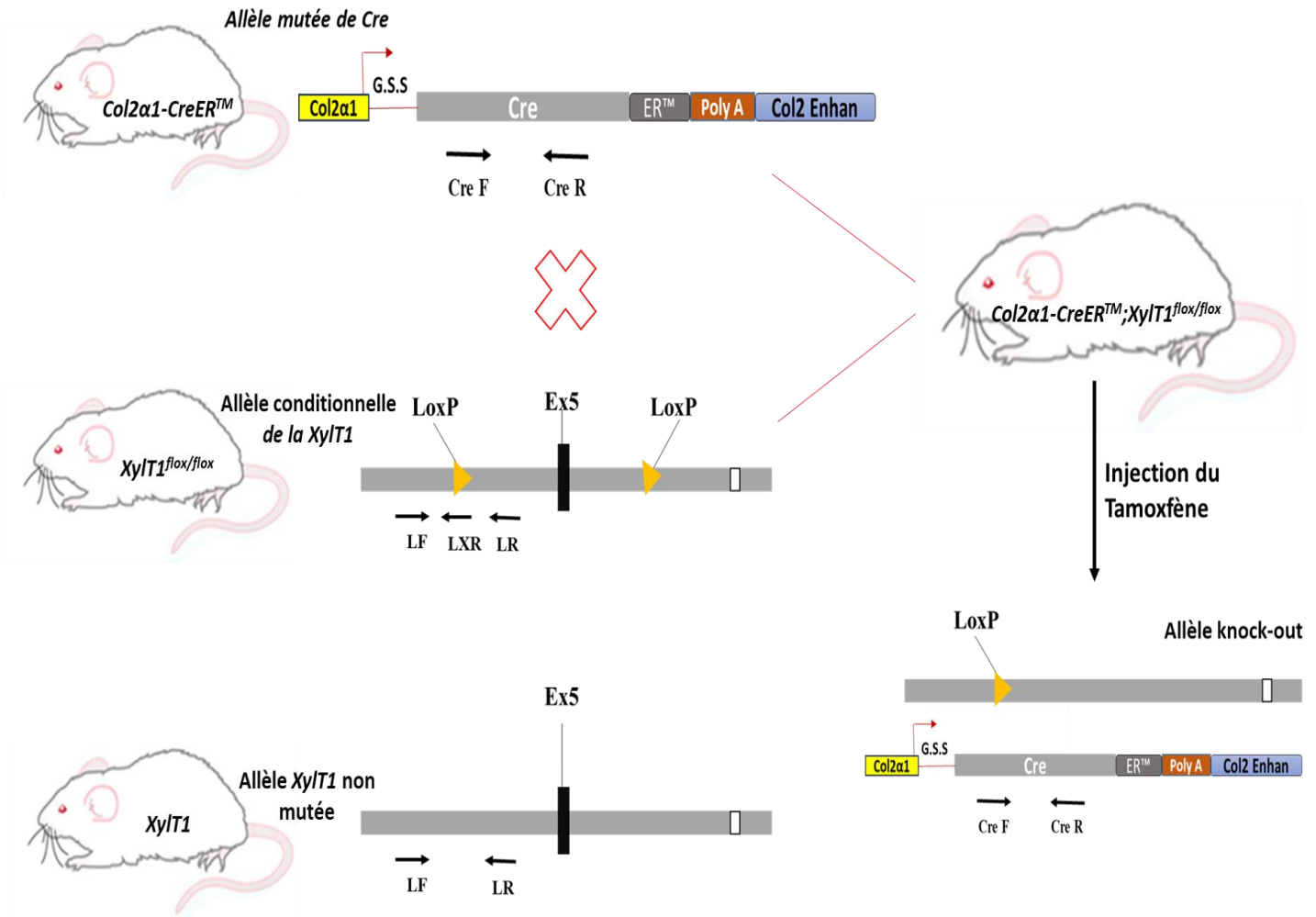


Figure 31 : Schéma illustrant la stratégie de construction et de croisement des souris knockout conditionnelles ainsi que la position des différentes amorces utilisées pour chaque allèle.

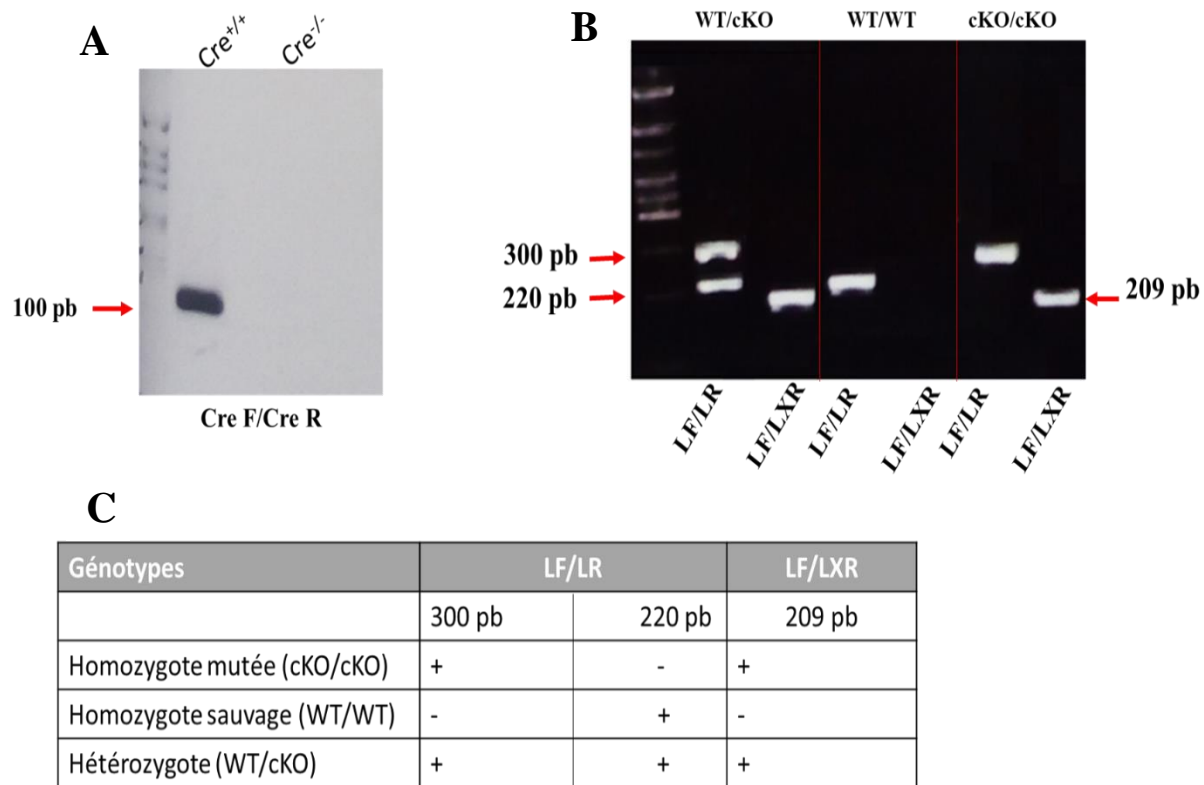


Figure 32 : Représentation schématique de la génération des souris *Col2a1-CreERTM;XylT1^{flox/flox}*. **A-** Génotypage des souris transgéniques portant le gène *Cre*, *Col2a1-CreERTM* (*Cre^{+/+}*) et des souris sauvages WT (*Cre^{-/-}*). **B-** Génotypage des souris transgéniques *Col2a1-CreERTM;XylT1^{flox/flox}* pour identifier l'insertion des sites *loxP* au niveau du gène *XylT1*. **C-** Taille des produits de PCR obtenus pour le génotypage (LF/LR et LF/LXR). *Cre* : P1 phage-derived integrase ; *Col2a1* : promoteur du *col2a1* ; *G.S.S* : β -globin splice sequence ; *ERTM* : élément de réponse au tamoxifène ; *Ex5* : exon 5 ; *CreR* : *Cre* recombinase forward primer ; *CreF* : *Cre* recombinase reverse primer ; *LF* : *XylT1* forward primer ; *LR* : *XylT1* reverse primer ; *LXR* : *LoxP* reverse primer ; *pb* : paire de bases. Les flèches indiquent la taille des produits correspondant aux différents allèles. + : présence ; - : absence.

2. Les souris *Col2a1-CreERTM;XylTI^{fllox/fllox}* présentent un nanisme prononcé et une réduction importante de la taille de leurs membres supérieurs et inférieurs

Afin d'élucider le rôle de la XT-I dans le développement ostéoarticulaire, un modèle de souris *knockout* conditionnel pour la *XylTI* (*Col2a1-CreERTM;XylTI^{fllox/fllox}*) a été développé. Ce modèle nous permet d'invalider le gène *XylTI* spécifiquement dans les chondrocytes à un moment bien défini par injection du tamoxifène. Les souris *Col2a1-CreERTM;XylTI^{fllox/fllox}* ont été séparées en deux groupes. Le premier groupe correspond aux souris nommées sauvages (WT) qui reçoivent 50 µl de la solution de solubilisation, l'huile de maïs. Le deuxième groupe nommé cKO est constitué de souris injectées avec 50 µl d'une solution de tamoxifène 100 µg/g. Les injections sont effectuées à l'âge d'une semaine, suivie de trois injections à un intervalle de deux semaines (Figure 33).

Durant cette période, les souris ont été suivies de façon hebdomadaire afin de vérifier si cette déficience a un impact sur leur poids corporel, leur mouvement dans la cage, leur capacité à accéder à la nourriture et dans le but de contrôler leur santé. Le suivi hebdomadaire de ces paramètres n'a pas montré de différence entre les deux groupes, à l'exception du poids corporel. L'analyse de la courbe de poids n'a pas montré de différences significatives entre les souris WT et cKO âgées de 7 jours (à la même date d'injection de tamoxifène) mais a montré une perte du poids chez les souris cKO âgées de 4 et 8 semaines (Figure 34).

L'analyse morphologique des souris cKO à différents âges révèle une réduction de la taille du corps (Figure 35 F) et de la queue par rapport aux souris WT (Figure 35 G). En effet, l'analyse phénotypique du squelette des souris âgées de 8 semaines montre une réduction de 20 % de la taille du corps entier (corps et queue) des souris cKO comparées aux souris sauvages (Figure 36 A, B). Cette réduction touche aussi bien les membres supérieurs que les membres inférieurs avec une réduction de 25% des fémurs et de 30% des tibias chez les souris mutées (Figure 36 C, D).

Afin de s'assurer que ce nanisme observé chez les souris cKO est causée par la déficience en *XylTI*, des souris *Col2a1-CreERTM* séparées en deux groupes ont été utilisées. Le premier groupe contrôle a reçu des injections de l'huile de maïs (Contrôle), alors que le deuxième groupe a reçu la même dose de tamoxifène injectée aux souris *Col2a1-CreERTM;XylTI^{fllox/fllox}*. La comparaison des deux groupes de souris ne montre pas de différence ni de taille ni des éléments squelettiques (Figure 37 A, B). De plus, nous n'avons pas détecté de différences ni de la morphologie ni de l'épaisseur de la plaque de croissance (Figure 37 C).

Ces résultats montrent bien que le phénotype et la morphologie observés chez les souris cKO sont liées uniquement à l'invalidation de gène *Xylt1*.

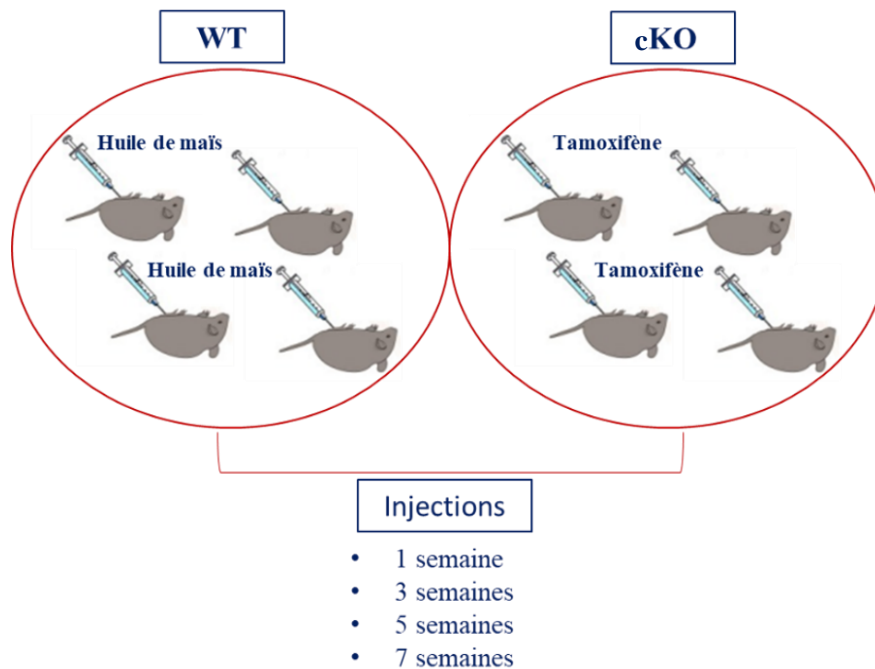


Figure 33 : Représentation schématique des injections intrapéritonéales chez les souris postnatales. Les injections sont réalisées à l'aide des seringues de 0.5 ml et des aiguilles de 23 G pour les souris adultes. La première injection est réalisée à l'âge d'une semaine. Les 3 autres à l'âge de 3, 5 et 7 semaines.

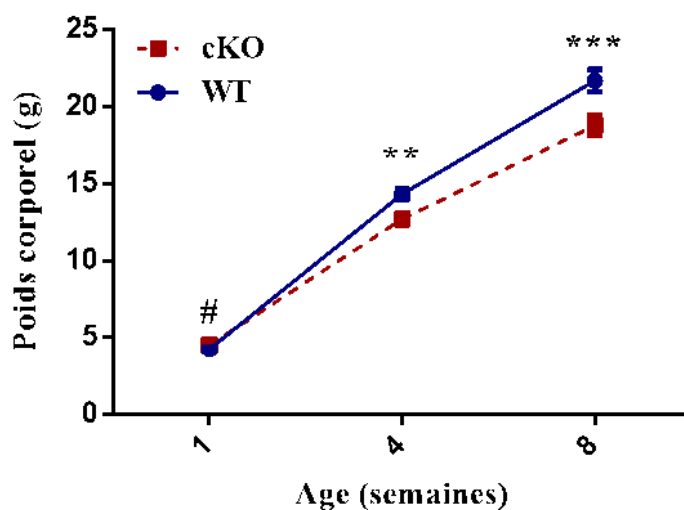


Figure 34 : Mesure du poids corporel des souris âgées de 1, 4 et 8 semaines. La mesure est faite par une balance électronique. La significativité statistique est évaluée en utilisant le test 2way ANOVA. $p < 0,01$ (**) ou $p < 0,001$ (***).

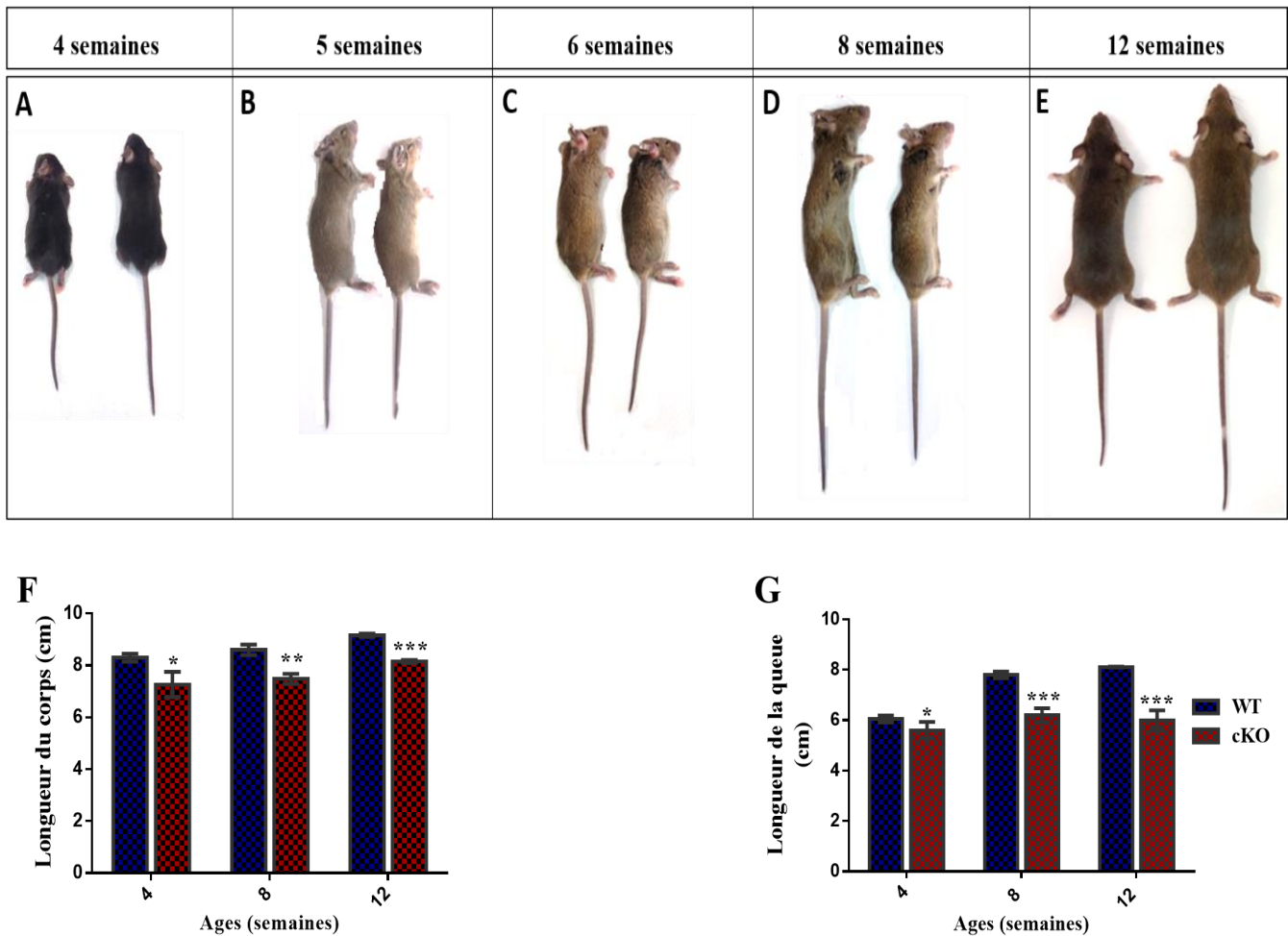


Figure 35 : Réduction de la taille du corps et de la queue des souris $Col2a1-CreER^{TM};XylT1^{lox/lox}$ à différents âges. *A-E- Photos present des souris WT et cKO adultes. F- Graphe montrant la longueur du corps en cm des souris cKO et WT à différents âges. G- Graphe montrant la longueur de la queue en cm des souris cKO et WT à différents âges. La significativité statistique est évaluée en utilisant le test 2way ANOVA. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) ou $p < 0,001$ (***)*.

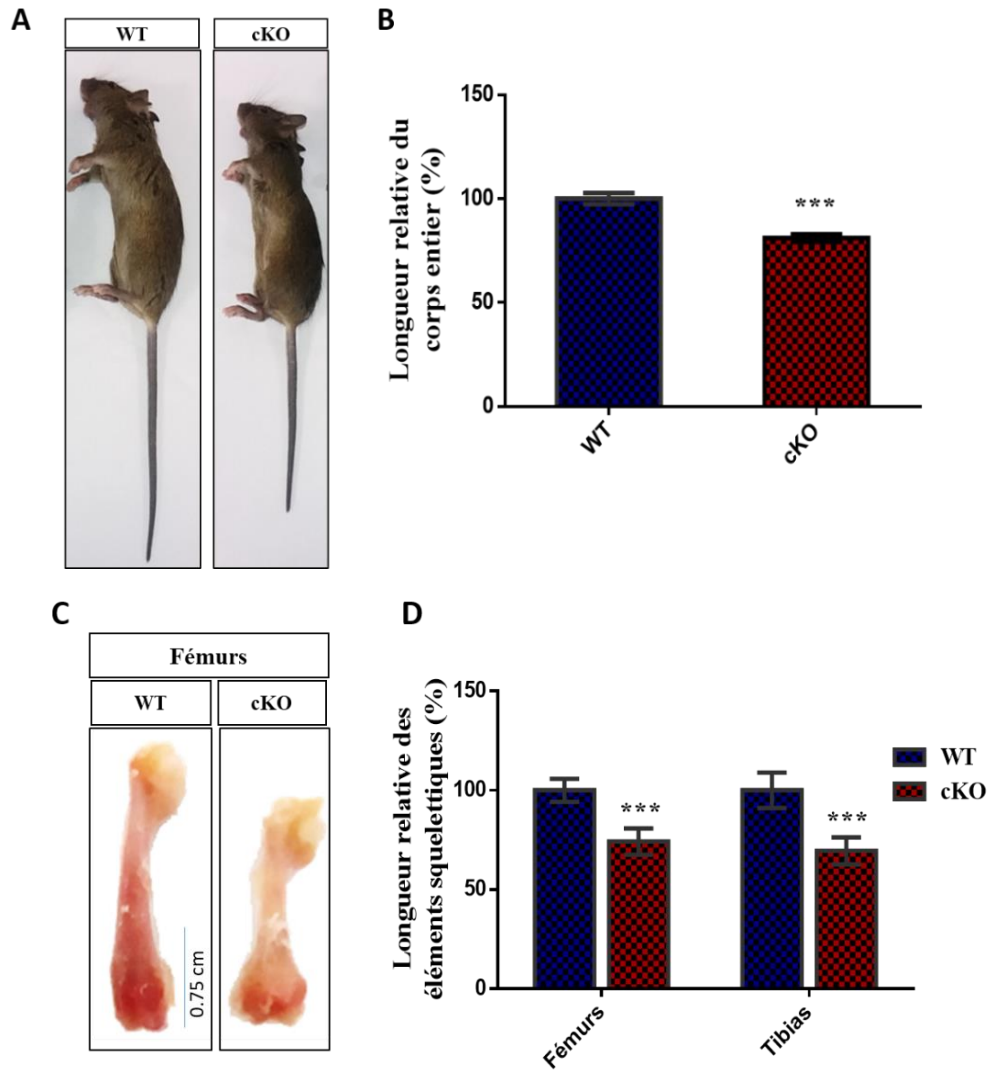


Figure 36 : Réduction de la taille du corps entier et des éléments squelettiques des souris *Col2a1-CreERTM;XylIT^{flox/flox}* âgées de 8 semaines. A- Photos des souris WT et cKO. B- Graphe montrant la taille du corps entier des souris cKO comparée à celle des souris WT. C- Longueur des fémurs des souris WT et cKO. Échelle = 0.75 cm. D- Graphe montrant la longueur des éléments squelettiques cKO par rapport aux WT. Les valeurs sont normalisées de sorte que la longueur du corps des souris sauvages soit fixée à 100%. La significativité statistique est évaluée en utilisant le test t test et 2way ANOVA. $p < 0,001$ (*)).**

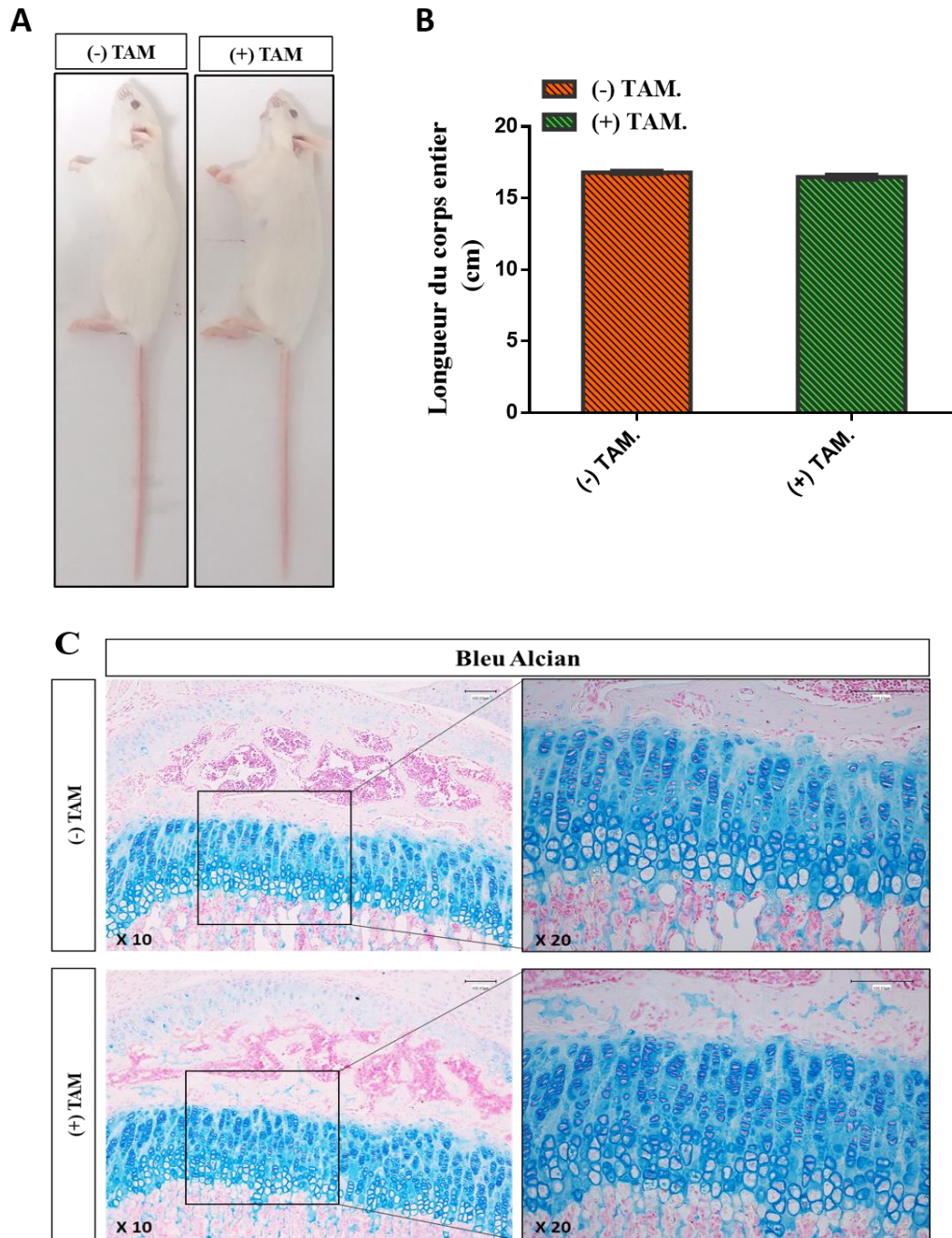


Figure 37 : Taille du corps des souris *Col2a1-CreERTM* âgées de 4 semaines.
A- Images des souris injectées (+TAM) ou non (- TAM) avec du tamoxifène. B- Graphe montrant la longueur du corps en cm des souris injectées (+ TAM) comparée à celle des souris non injectées (- TAM). C- Vue microscopique des plaques de croissances colorées au bleu Alcian. Échelle : 100µm.

3. Les souris *Col2a1-CreERTM;XylTI^{flox/flox}* affichent des différences marquées de leurs éléments squelettiques

Après avoir analysé la morphologie externe des souris cKO en les comparant avec les souris sauvages, nous aborderons dans cette partie, d'une façon plus détaillée, les effets de l'inactivation de la *XylTI* sur les différents éléments squelettiques. Nous avons réalisé une coloration du squelette total par le bleu Alcian et la rouge Alizarine. Le premier colorant est utilisé en histologie pour détecter les chaînes de GAGs des PGs en mettant en évidence les tissus cartilagineux riches en PGs. Alors que le deuxième colorant permet la détection des dépôts de calcium dans les vaisseaux et les tissus osseux. Le squelette entier des souris âgées de 4 semaines ont été colorées par le bleu Alcian et le rouge Alizarine. L'analyse phénotypique des souris cKO a montré un nanisme caractérisé par un raccourcissement des squelettes axiaux et appendiculaires (Figure 38 A), une réduction de la taille du crâne (Figure 38 B), de la cage thoracique (Figure 38 C), de la queue (Figure 38 E), de la taille des membres inférieurs et supérieurs et des phalanges (Figure 39 A-F), une réduction de la taille des disques intervertébraux (Figure 40 A) et des côtes plus élargis (Figure 40 B). Ces souris montrent également un défaut de synthèse des GAGs qui est marqué au niveau des articulations (cercle jaune) (Figure 39 C).

Nous avons observé chez ces souris âgées d'un mois une ossification de la trachée (marquée par une coloration rouge au milieu des anneaux) et une réduction du contenu cartilagineux au niveau de ces anneaux (Figure 38 D). Ce résultat à confirmer semble être important notamment dans les études des pathologies respiratoires. Notre modèle de souris pourrait servir alors de modèle d'étude.

Au total, ces résultats montrent que la XT-I joue un rôle essentiel dans la morphogénèse des os longs formés par ossification endochondrale et que sa délétion peut également entraîner des problèmes respiratoires.

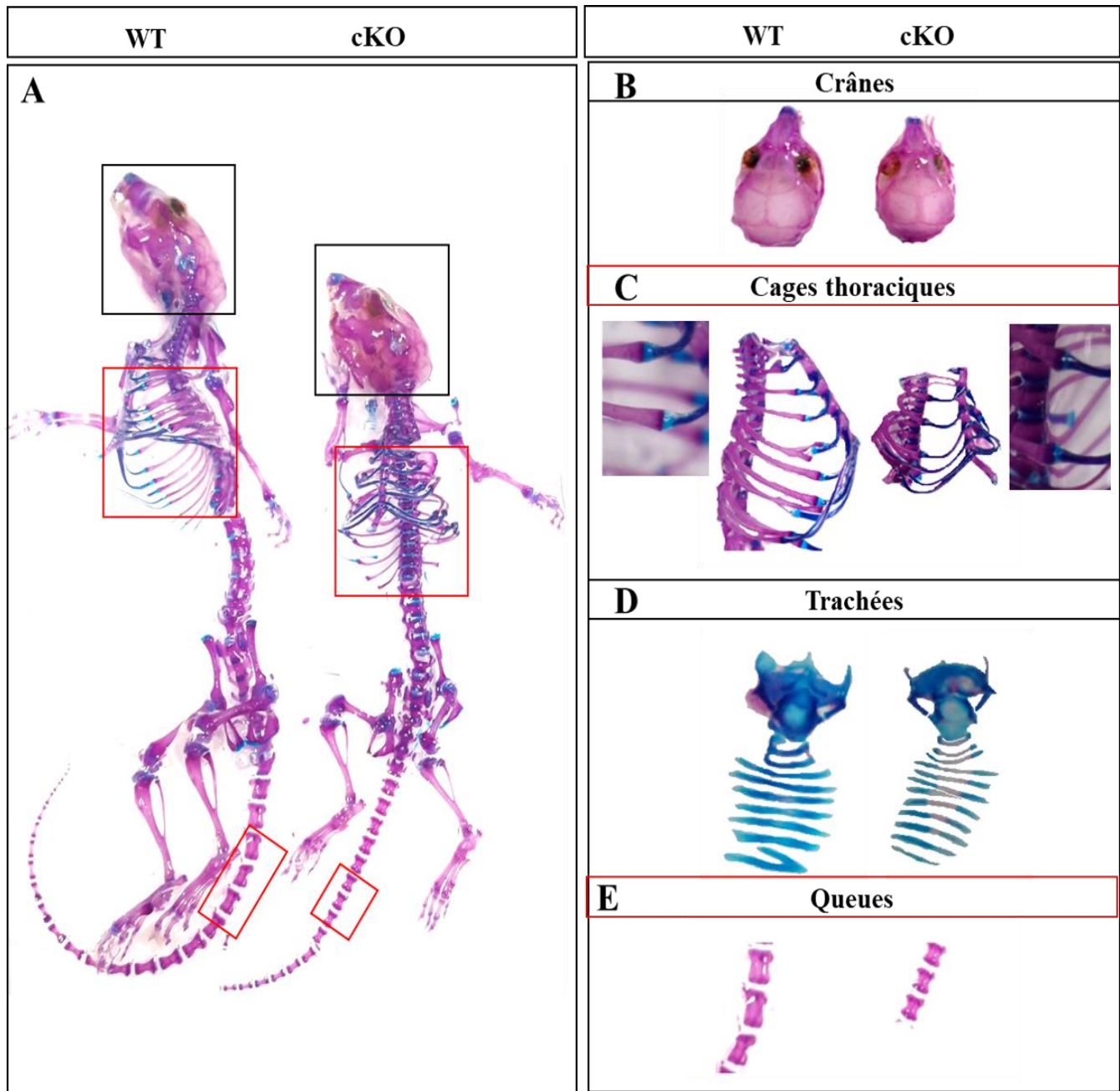


Figure 38 : Changements phénotypiques des souris $Col2a1-CreER^{TM};XylIT^{flox/flox}$ âgées de 4 semaines. *Bleu* = tissus cartilagineux, *Rouge* = tissus osseux marqués. *A-* Squelette axial et appendiculaire. *B-* Taille du crâne. *C-* Cage thoracique. *D-* Trachée. *E-* Éléments structuraux de la queue.

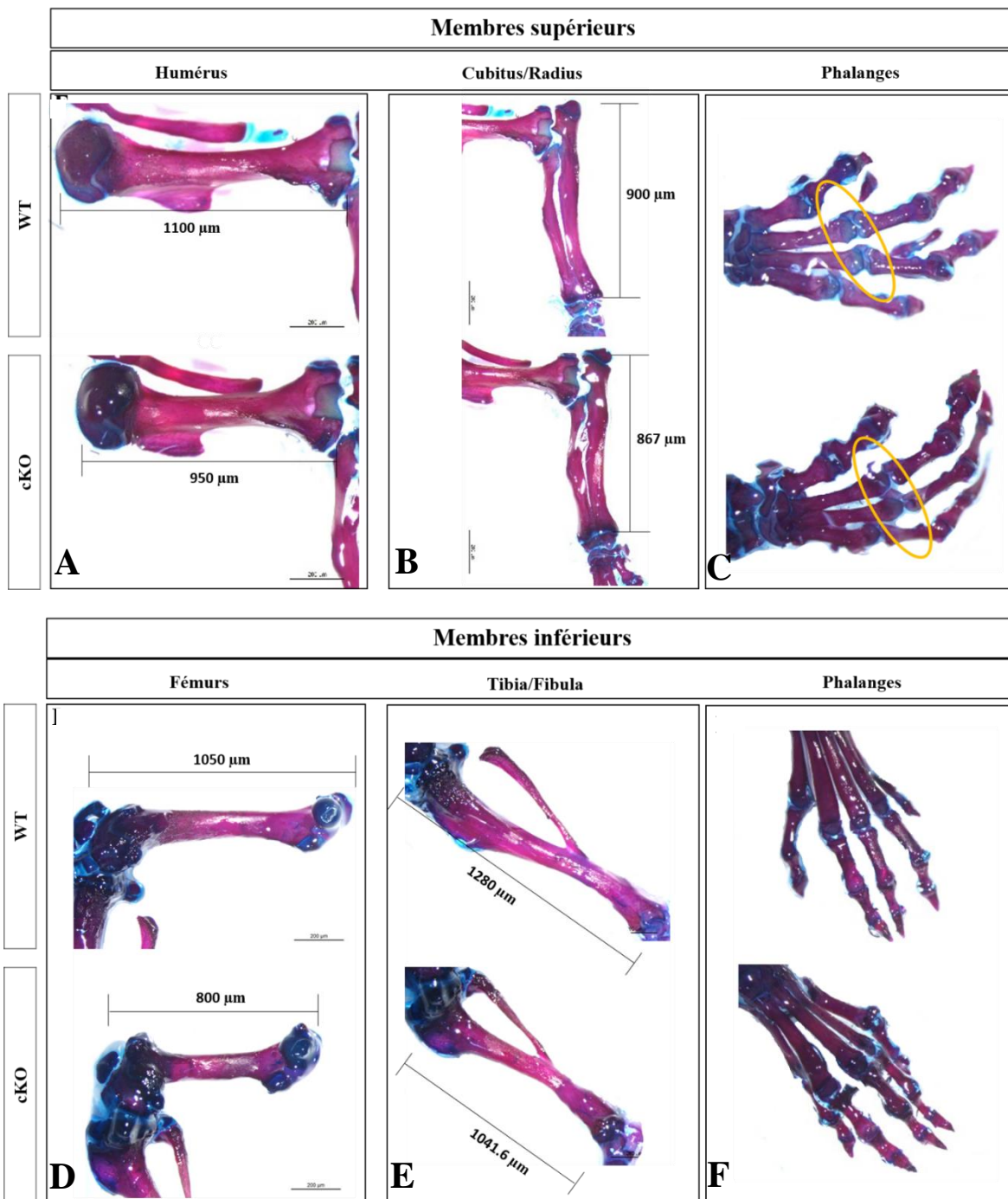


Figure 39 : Changements phénotypiques des éléments du squelette appendiculaire des souris $Col2a1-CreER^{TM};XylTI^{flox/flox}$ âgées de 4 semaines. Bleu = tissus cartilagineux, Rouge = tissus osseux marqués. A-C- Taille des membres supérieurs. D-F- Taille des membres inférieurs. Échelle : 200 μ m.

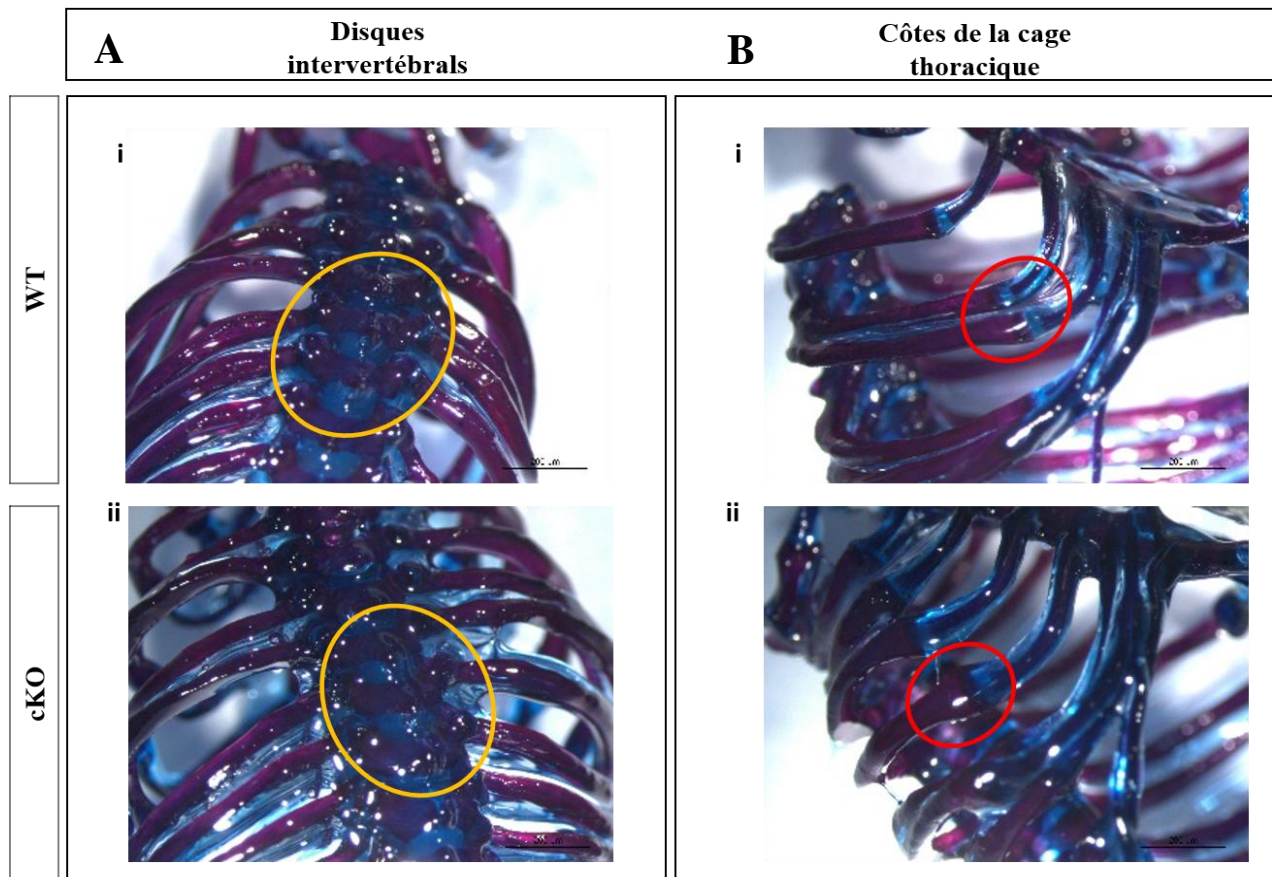


Figure 40 : Changements phénotypiques des disques intervertébraux et de la cage thoracique des souris $Col2a1-CreER^{TM};XylTI^{flox/flox}$ âgées de 4 semaines. Bleu = tissus cartilagineux, Rouge = tissus osseux marqués. A- Disques intervertébraux (cercles jaunes). B- Côtes (cercles rouges) au niveau de la cage thoracique. i- WT, ii- cKO. Échelle : 200 μ m.

4. Les souris adultes *Col2a1-CreERTM;XylTI^{flox/flox}* présentent des défauts structuraux au niveau de leurs os et une résorption osseuse importante

L'analyse histologique des souris postnatales cKO a montré des anomalies squelettiques qui pourraient être associées à des défauts structuraux des os. Afin d'identifier de potentiels défauts, une microtomographie à rayons X (μ CT) a été réalisée sur des souris adultes âgées de 8 semaines. L'analyse par μ CT des fémurs des souris a permis de montrer une augmentation de l'épaisseur des trabécules (Tb.Th) (Figure 41 A'', B'', C) (Tableau 9), tandis que leur nombre est réduit (Tb.N) (Figure 41 A, A', B, B', C) (Tableau 9), suggérant une résorption osseuse importante ou des défauts de formation osseuse chez les souris déficientes en XT-I.

La densité minérale osseuse (BMD) quant à elle montre une diminution chez les souris cKO, suggérant ainsi une susceptibilité au développement d'ostéoporose (Figure 41 C) (Tableau 9). En revanche, la TMD qui correspond à la densité spécifique de l'os minéralisé montre une augmentation chez les souris cKO, suggérant ainsi une induction du processus de minéralisation (Figure 41 C) (Tableau 9).

L'os cortical est formé par la différenciation directe du périchondre en ostéoblastes. L'analyse par μ CT a montré une augmentation de l'épaisseur corticale chez les souris cKO (Figure 38 A''', B''', C), suggérant une augmentation dans l'ossification endochondrale et la formation osseuse périostée. Aucune modification significative du volume osseux (BV/TV), de la séparation trabéculaire (Tb.Sp), du facteur de structure trabéculaire (Tb.Pf) et de l'indice du modèle de structure (SMI) n'a été observée (Figure 38 C). Les souris cKO présentent en revanche une large épiphyse fémorale et une tête fémorale plus développée (plus grande en surface) que celles des souris WT (Figure 41 D, E).

L'analyse de l'activité enzymatique de TRAP (Tartrate-resistant acid phosphatase) a montré une augmentation importante du nombre des ostéoclastes (N.Oc/SO) dans l'os trabéculaire chez les souris mutées surtout au niveau de la zone de transition des cellules hypertrophiques et l'os trabéculaire (Figure 42). Ce qui suggère que l'inactivation du gène *XylTI* entraîne une résorption osseuse importante caractérisée par une augmentation du nombre des ostéoclastes.

L'ensemble de ces résultats indique que l'enzyme XT-I joue un rôle essentiel aussi bien dans l'ossification endochondrale que périostée, et que son expression est un facteur important dans le maintien de l'homéostasie osseuse.

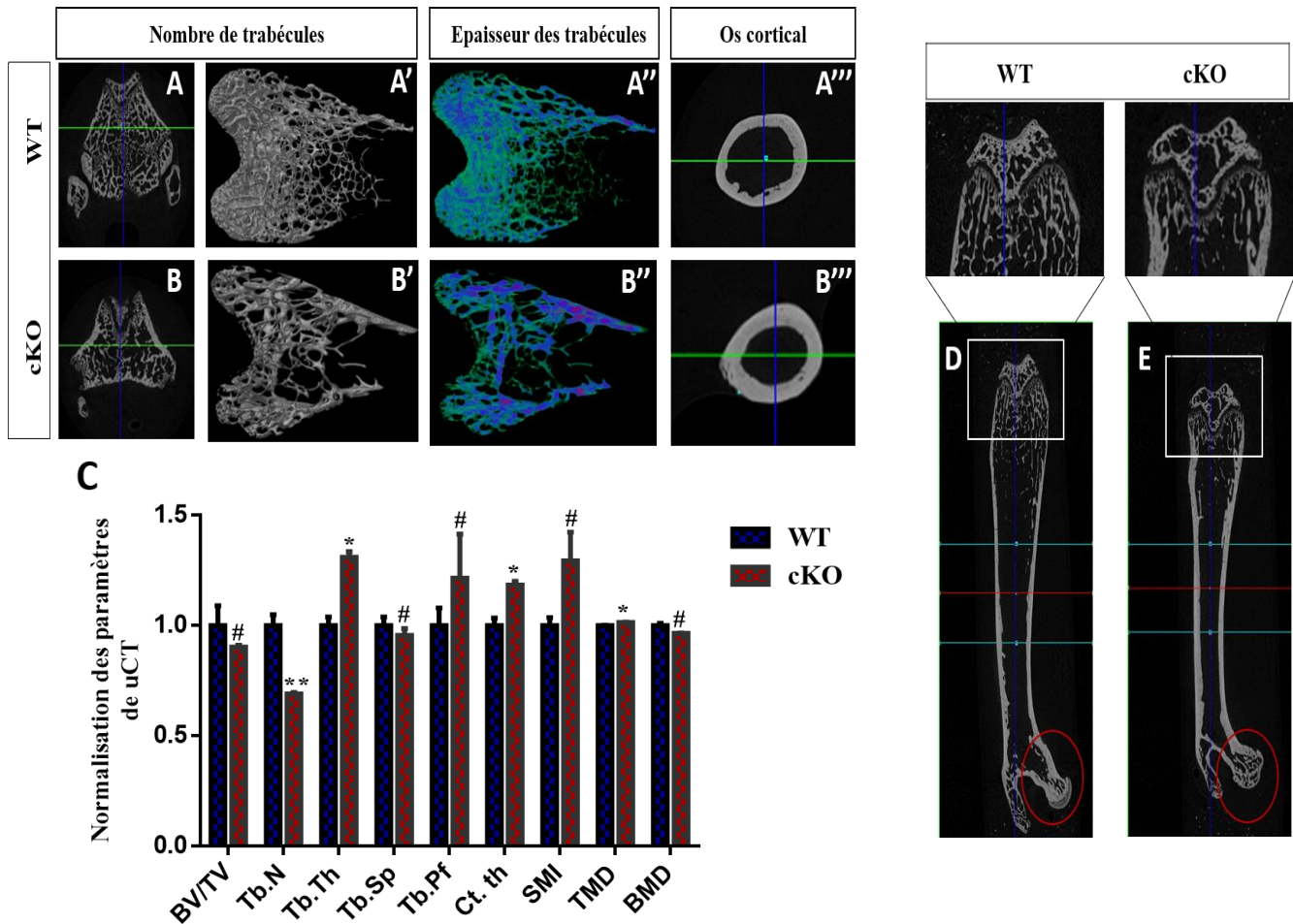


Figure 41 : Microtomographie à rayons X (μ CT) des os longs des souris *Col2a1-CreERTM;XylTI^{flox/flox}* et sauvages âgées 8 semaines. A-A''', B-B'''- Analyse μ CT des fémurs révèle des défauts de l'os trabéculaire de la diaphyse et de l'os cortical chez les souris mutées. Nombre de trabécules (A, A'', B, B''). Os cortical chez les souris cKO (B''') et les souris WT (A'''). C- Paramètres osseux : les valeurs sont normalisées de sorte que les mesures chez le contrôle sont définies comme étant égale à 1. D, E- Epiphyse fémorale (E, carré blanche). Tête fémorale (cercle rouge).

Bone parameters	Symbols	Unit measures	WT (Average ± SD)	cKO (Average ± SD)
Tissue volume	TV	mm ³	5.12 ± 0.52	2.30 ± 0,22
Bone volume	BV	mm ³	0.54 ± 0.03	0.22 ± 0,02
Percent bone volume	BV/TV	%	10.68 ± 1.63	9.38 ± 0,16
Tissue surface	TS	mm ²	26.96 ± 0.26	18.07 ± 1,7
Bone surface	BS	mm ²	48.07 ± 1.06	17.06 ± 1,52
Intersection surface	i.S	mm ²	3.14 ± 0.64	2.70 ± 0,09
Bone surface / volume ratio	BS/BV	1/mm	88.81 ± 6.44	79.16 ± 0,83
Bone surface density	BS/TV	1/mm	9.43 ± 0.76	7.42 ± 0,05
Trabecular pattern factor	Tb.Pf	1/mm	20.93 ± 2.71	23.62 ± 6,76
Centroid (x)	Crd.X	mm	1.38 ± 0,02	1.25 ± 0,04
Centroid (y)	Crd.Y	mm	3.66 ± 0,03	3.14 ± 0,38
Centroid (z)	Crd.Z	mm	3.39 ± 0,24	3.51 ± 0,18
Moment of inertia (x)	MMI(x)	mm ⁵	0.52 ± 0,02	0.12 ± 0,07
Moment of inertia (y)	MMI(y)	mm ⁵	0.25 ± 0,02	0.11 ± 0,02
Moment of inertia (z)	MMI(z)	mm ⁵	0.74 ± 0,01	0.22 ± 0,04
Polar moment of inertia	MMI(polar)	mm ⁵	0.75 ± 0,01	0.23 ± 0,04
Radius of gyration (x)	Gr.R(x)	mm	0.97 ± 0	0.75 ± 0,23
Radius of gyration (y)	Gr.R(y)	mm	0.68 ± 0,04	0.69 ± 0,05
Radius of gyration (z)	Gr.R(z)	mm	1.16 ± 0,02	1.01 ± 0,14
Polar radius of gyration	Gr.R(polar)	mm	1.17 ± 0,02	1.02 ± 0,13
Product of inertia (xy)	Pr.In(xy)	mm ⁵	-0.06 ± 0,02	0.00 ± 0,02
Product of inertia (xz)	Pr.In(xz)	mm ⁵	0.00 ± 0,003	0.00 ± 0
Product of inertia (yz)	Pr.In(yz)	mm ⁵	0.00 ± 0,01	0.00 ± 0
Total orientation (theta)	T.Or(theta)	°	89.31 ± 0,59	89.15 ± 0,51
Total orientation (phi)	T.Or(phi)	°	192.42 ± 125,87	146.65 ± 191,58
Structure model index	SMI		1.53 ± 0,1	1.97 ± 0,34
Trabecular thickness	Tb.Th	mm	0.04143 ± 0,002	0.05295 ± 0
Trabecular number	Tb.N	1/mm	2.571175 ± 0,22	1.771365 ± 0,03
Trabecular separation	Tb.Sp	mm	0.29538 ± 0,02	0.29186 ± 0,02
EP cortical thickness	Ct. th	mm	0.2 ± 0,02	0.23 ± 0,02
Bone mineral density	BMD	mg/cc	1.037265 ± 0,0153	1.00131 ± 0,00285
Tissue mineral density	TMD	mg/cc	1.406955 ± 0,003	1.42638 ± 0,0041

Tableau 9 : Analyse quantitative des paramètres histomorphométriques dynamiques et statiques au niveau des fémurs des souris *Col2a1-CreERTM;XylTI^{flox/flox}* et sauvages âgées de 8 semaines. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD. Nombre d'échantillons $N = 6$ souris. WT : souris injectées avec l'huile de maïs. cKO : souris injectées avec le tamoxifène.

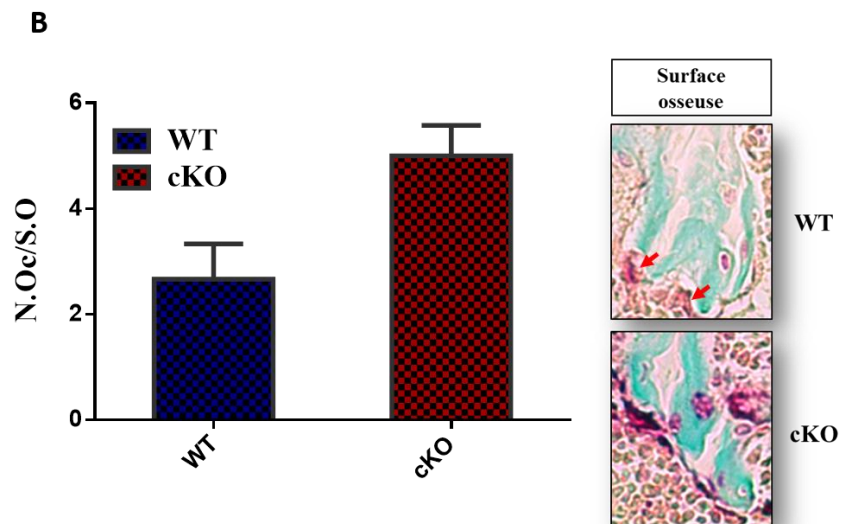
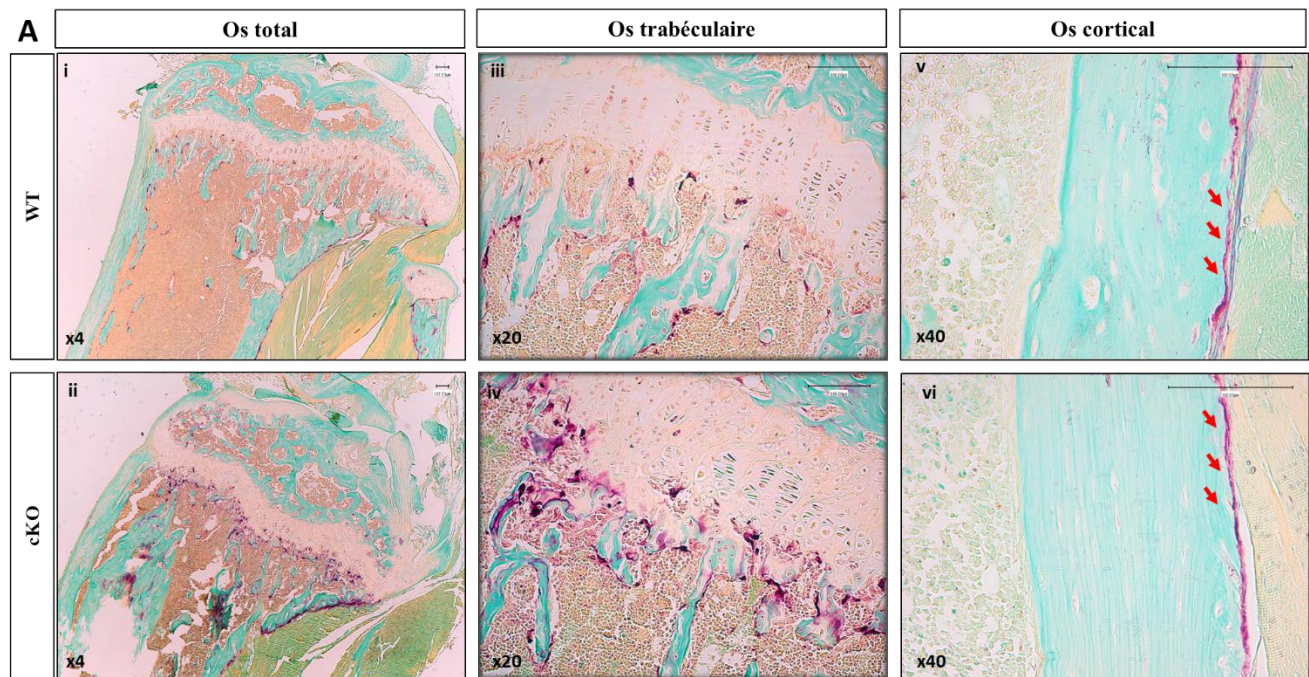


Figure 42 : Résorption osseuse importante chez les souris $Col2a1-CreER^{TM};XylT1^{lox/lox}$. *A- Coloration TRAP réalisée sur des coupes histologiques de tibias des souris âgées 8 semaines et contre-colorée par une solution de Fast-Green. i, ii- Tibias. iii, iv- Os trabéculaire des souris. v, vi- Os cortical. B- Quantification du nombre d'ostéoclastes par surface osseuse (N.Oc/S.O). Les flèches rouges indiquent les ostéoclastes. Échelle : 100 μ m.*

5. Défaut de synthèse des GAGs et désorganisation de la plaque de croissance chez les souris *Col2a1-CreERTM;XylTI^{flox/flox}*

Il a été montré au laboratoire que la XT-I régule la synthèse des PGs en catalysant une étape limitante de la synthèse des chaînes de GAGs (Venkatesan et al., 2012). Afin d'étudier l'effet de l'inactivation de la *XylTI* sur la synthèse des GAGs au cours de l'ossification endochondrale, des coupes histologiques au niveau du genou des souris âgées de 8 semaines ont été colorées par le bleu Alcian et la safranine-O pour révéler les GAGs. Nous n'avons pas observé de différence significative de coloration bleu et rouge orangée du cartilage articulaire chez les souris WT et cKO (Figure 43 A-C). Par contre, une distribution hétérogène des GAGs marquée par une différence d'intensité des colorations (bleu Alcian et Safranine-O) chez les souris cKO (Figure 44 A, B) est observée au niveau de la plaque de croissance. En outre, la coloration HES montre une désorganisation et une hypocellularité au niveau de la plaque de croissance des souris mutées (Figure 44 C). En effet, la zone des chondrocytes hypertrophiques est réduite en taille et les chondrocytes au niveau de la zone colonnaire ne sont pas organisés en colonne et contient moins de cellules (Figure 44 C).

La mesure de l'épaisseur de la plaque de croissance montre que chez les souris cKO, celle-ci est plus épaisse de 60% que celle des souris sauvages (Figure 44 D).

Ces résultats suggèrent que la XT-I est un facteur important dans la régulation de l'organisation et de la maturation de la plaque de croissance. Nous avons émis l'hypothèse que les souris cKO pourraient avoir un retard de croissance et une immaturité chondrocytaire, ce qui va influencer le déroulement du processus d'ossification endochondrale.

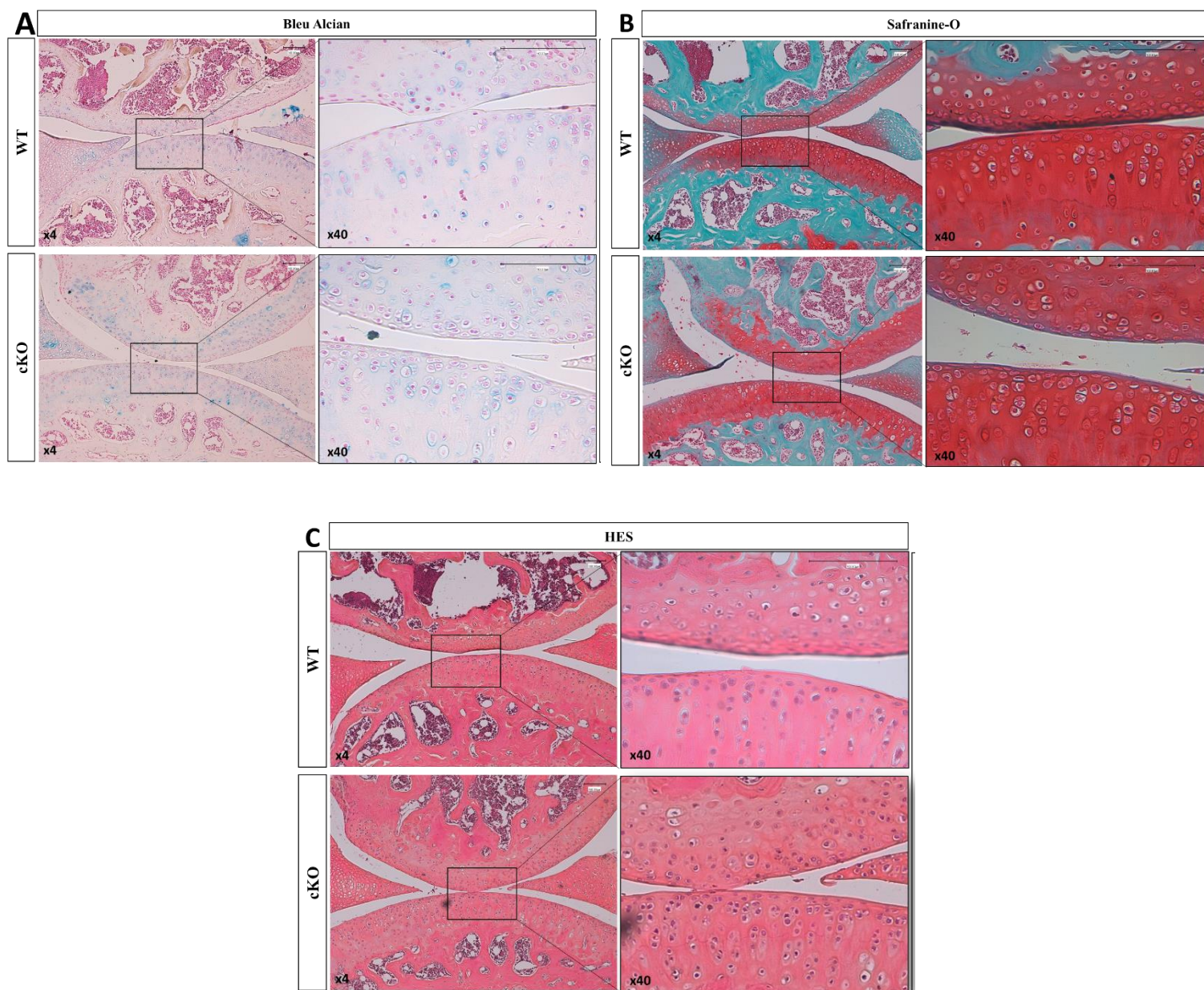


Figure 43 : Des études histologiques du cartilage articulaire des souris âgées de 8 semaines. A-C- Coupes histologiques sagittales au niveau du cartilage articulaire. Coloration bleu Alcian (A), safranine-O (B) et hématoxyline (C). Échelle : 100 μm.

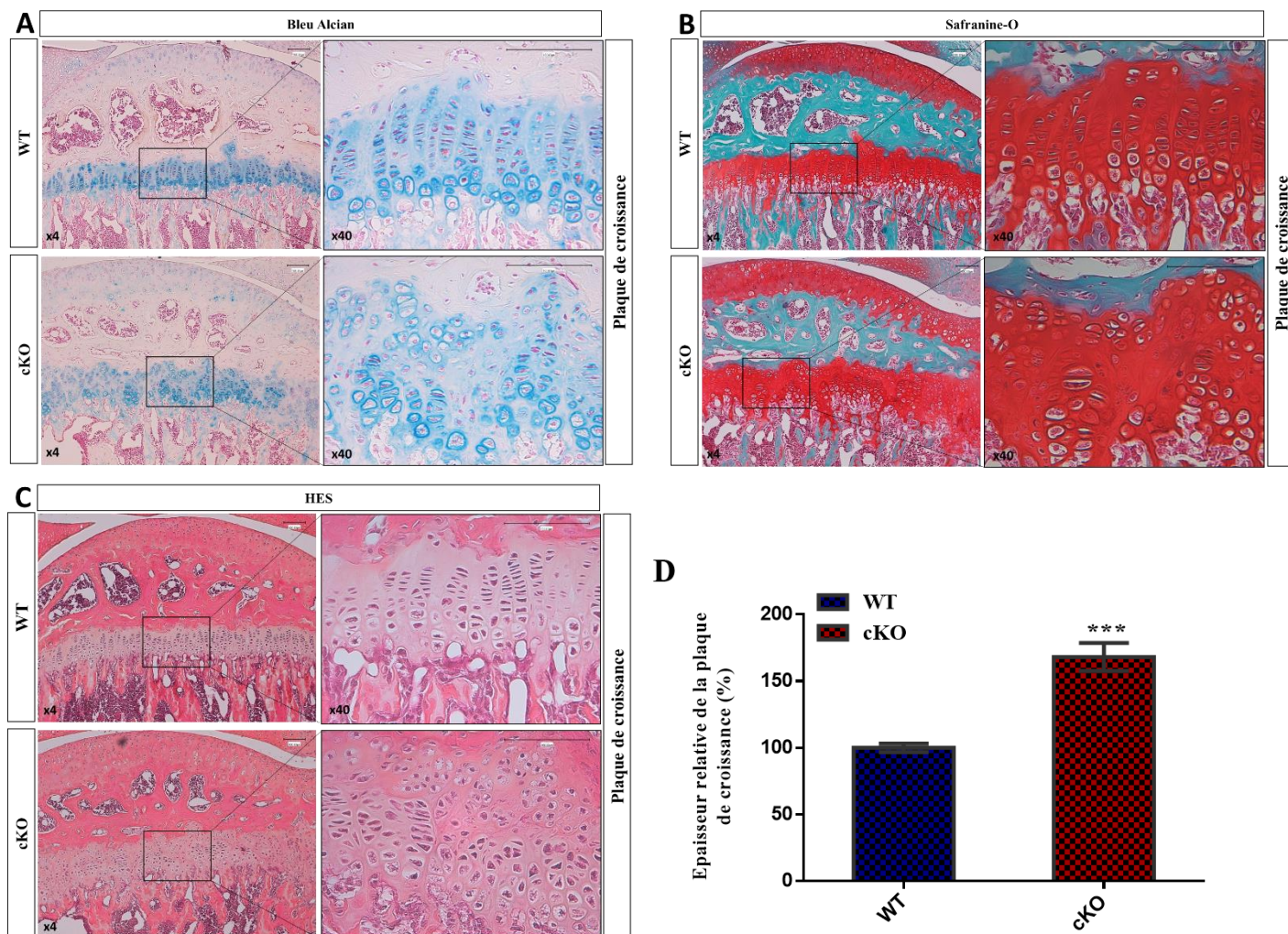


Figure 44 : Etudes histologiques de la plaque de croissance des souris âgées de 8 semaines. *A-* Coloration bleu Alcian. *B-* Coloration Safranin-O. *C-* Hématoxyline/Eosine/Safran. *D-* Graphe montrant l'épaisseur relative de la plaque de croissance des souris cKO par rapport aux souris WT. La significativité statistique est évaluée en utilisant le test *t*-Student $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) ou $p < 0,001$ (***). Échelle : 100 μ m.

6. Les souris *Col2a1-CreERTM;XylT1^{flox/flox}* présentent un défaut de chondrogenèse et d'ossification

Afin de comprendre les anomalies de développement observées chez les souris cKO âgées de 8 semaines, nous avons réalisé des études histologiques chez des souris plus jeunes. L'analyse des coupes histologiques de genoux des souris cKO et WT âgées de 4 semaines montrent une baisse de la synthèse des chaînes de glycosaminoglycanes (GAGs) des PGs au niveau de la plaque de croissance des souris mutées (Figure 45 A, B). De plus, on observe une hypocellularité et une réduction de la zone hypertrophique qui moins délimitée chez les souris cKO. Ces souris montrent également des chondrocytes moins entassées dans la zone proliférative de la plaque de croissance et une désorganisation flagrante de l'organisation en colonne des chondrocytes (Figure 45 C). La figure 45 D illustre la quantification de l'épaisseur relative de la plaque de croissance des souris cKO âgées de 4 semaines par rapport aux souris WT. L'épaisseur est réduite de 12% chez les souris cKO. La comparaison de l'épaisseur de la plaque de croissance à l'âge de 4 et 8 semaines montre que celle-ci diminue chez les souris au cours de la croissance postnatale, mais que cette diminution était moins accentuée chez les souris cKO (Figure 45 E). Ces observations suggèrent l'implication de la *XylT1* dans la croissance postnatale qui, une fois invalidée, peut provoquer une accélération de la croissance, suivie d'un ralentissement à des stades plus avancés chez les souris mutantes.

Nous avons ensuite analysé les coupes histologiques frontales du tibia des souris âgées de 10 jours. L'examen montre une faible intensité de la coloration au bleu Alcian de la plaque de croissance des souris cKO reflétant ainsi la baisse de la biosynthèse des GAGs (Figure 46 B et C). Le centre d'ossification secondaire est réduit chez les souris mutantes et le nombre de cellules dans la zone hypertrophique est plus élevé (Figure 46 A). La vue détaillée de la plaque de croissance des souris mutées montre une réduction des zones préhypertrophique et hypertrophique sans avoir de différences remarquables dans les zones de repos et prolifératives (Figure 46 B, D). De plus, ces quatre zones ne sont pas bien délimitées chez les souris mutées. Les cellules de la zone proliférative sont de forme ronde et entassées les unes à côté des autres (cercle rouge) avec très peu de matrice extracellulaire entre les cellules (pauvre en GAGs) (Figure 46 C). Les GAGs péricellulaires sont fortement abondants chez les souris sauvages, ce qui n'est pas le cas chez les souris mutées (Figure 46 C). De façon intéressante, les chondrocytes de la zone proliférative ont une organisation en colonne mais les cellules filles ne sont pas aplaties et n'arrivent pas à effectuer la rotation pour se mettre l'une au dessous de l'autre (les colonnes sont formées par des groupes

de deux cellules). La mesure de l'épaisseur de l'épiphyse montre une réduction de celle-ci et des zones préhypertrophique et hypertrophique chez les souris cKO (Figure 46 D). La réduction des zones préhypertrophique et hypertrophique pourraient être due à une accélération de la différenciation en phase terminale des chondrocytes et à une accélération de l'ossification chez les souris cKO.

L'ensemble de ces résultats montre que la XT-I joue un rôle crucial dans la chondrogenèse et dans le processus d'ossification endochondrale. Son absence accélère la maturation des chondrocytes qui passent rapidement en phase terminale d'hypertrophie, ce qui pourrait expliquer la réduction de la zone hypertrophique et préhypertrophique. De plus, elle va perturber la structuration de la matrice en réduisant la synthèse des GAGs matriciels, influençant ainsi le contact cellule-cellule. Enfin, l'absence de la XT-I perturbe l'organisation en colonne des chondrocytes prolifératifs.

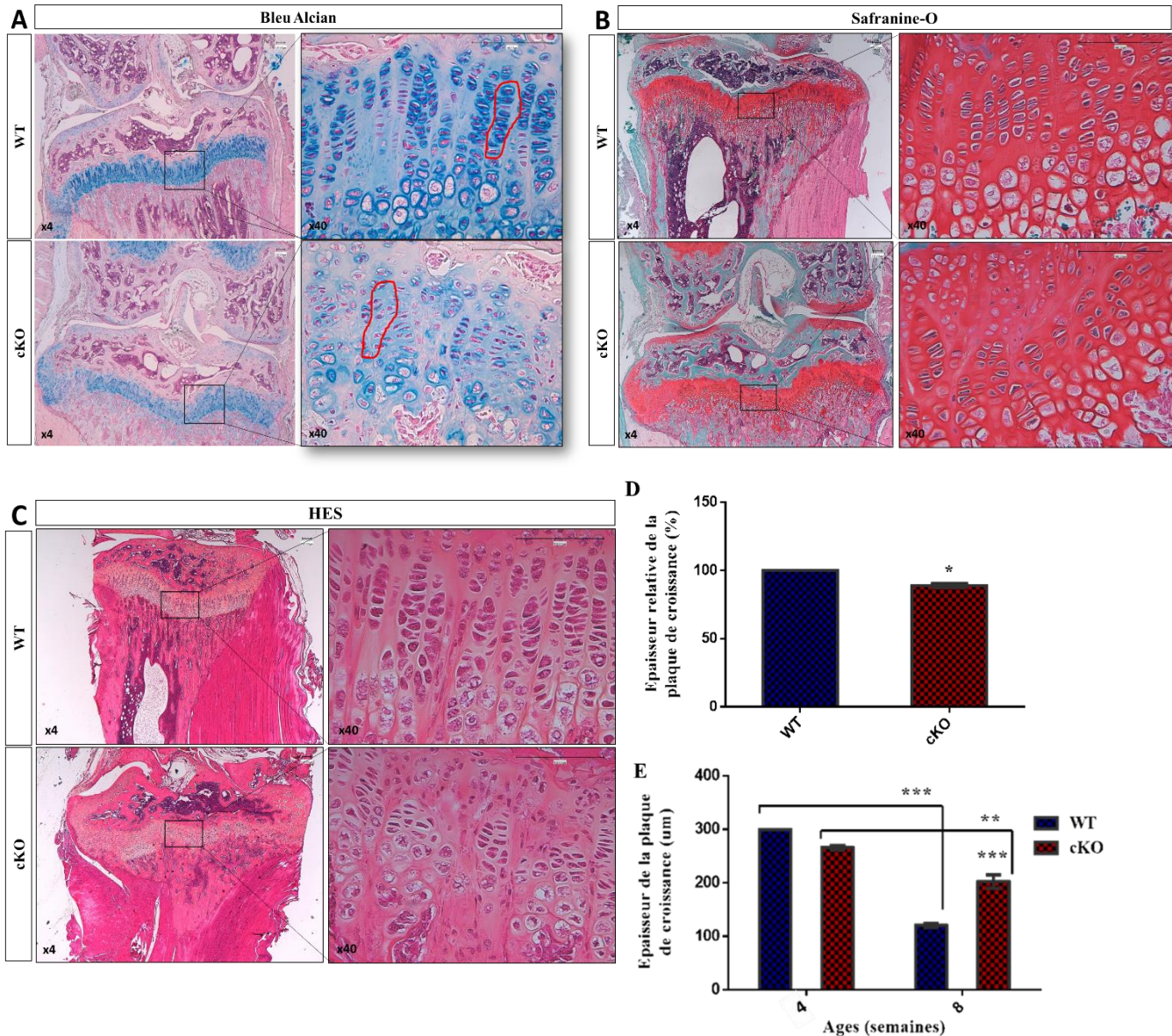


Figure 45 : Etudes histologiques de la plaque de croissance des souris WT et cKO âgées de 4 semaines. *A-C Coupes histologiques frontales au niveau du genou prise aux grossissements (x4 et x40) A- Coupes colorées au bleu Alcian, spécifique des GAGs. Cellules en colonne dans la zone proliférative (P). B- Coupes colorées à la Safranin-O. C- Coupes colorées à l'HES. D- Graphe montrant l'épaisseur relative de la plaque de croissance les souris cKO par rapport aux souris WT âgées de 4 semaines. Échelle : 100 μm. E- Graphe montrant une comparaison de l'épaisseur de la plaque de croissance des souris cKO et WT à deux âges différents (4 et 8 semaines). La significativité statistique est évaluée en utilisant le t-test et le test de 2way ANOVA, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) ou $p < 0,001$ (***)*

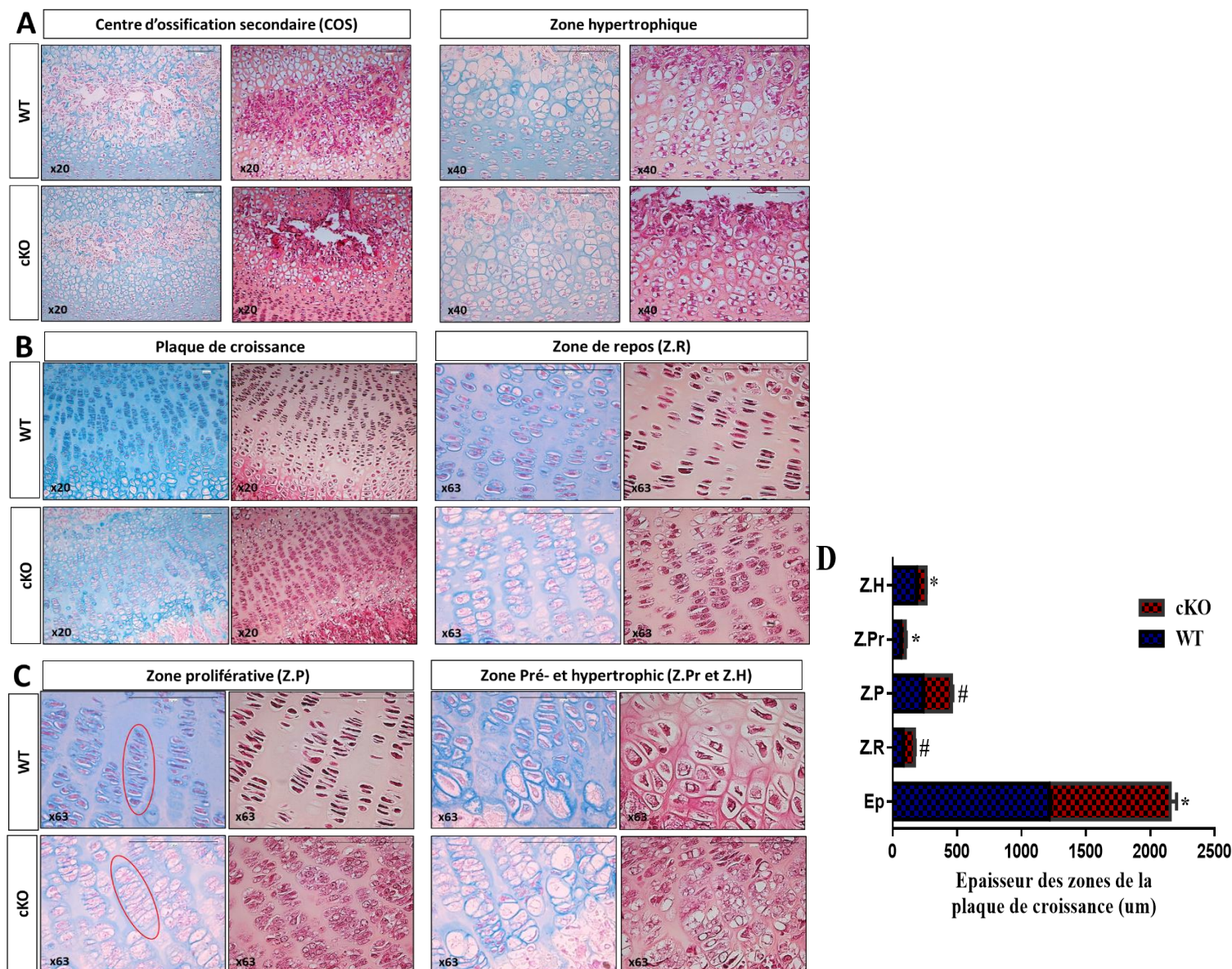


Figure 46 : Etudes histologiques de la plaque de croissance des souris sauvages et mutées âgées de 10 jours.
A-C- Coupes histologiques frontales du tibia coloré au bleu Alcian et à l'HES. **A-** Centre d'ossification secondaire et zone hypertrophique. **B-** Vue détaillée de la plaque de croissance et de la zone de repos. **C-** Vue détaillée des zones prolifératives et hypertrophiques. Chondrocytes (cercle rouge). Échelle : 100 µm. **D-** Quantification de l'épaisseur de l'épiphyse et des différentes zones de la plaque de croissance chez les souris sauvages (WT) et mutantes (cKO). COS : Centre d'ossification secondaire, Ep : épiphyse, Z.R : zone de repos. Z.P : zone proliférative. Z.Pr : zone préhypertrophique. Z.H : zone hypertrophique. La significativité statistique est évaluée en utilisant le t-test et le test de 2way ANOVA, $p < 0,05$ (*), # : non significative.

7. Les souris *Col2a1-CreERTM;XylTI^{flox/flox}* présentent des défauts d'organisation des fibres de collagènes matricielles dans la plaque de croissance

La plaque de croissance constitue un tissu dynamique qui favorise l'élongation osseuse à travers la prolifération des chondrocytes, leur hypertrophie et la production de la matrice extracellulaire. Cette matrice joue un rôle crucial dans l'arrangement et la géométrie des chondrocytes, la morphologie de la plaque de croissance et l'élongation des os. Elle est constituée essentiellement des fibres de collagène et de PGs. Au vu de son rôle, il est important de déterminer son organisation au niveau de la plaque de croissance chez les souris mutées. Pour cela des coupes sagittales des genoux ont été colorées au rouge Sirius, colorant spécifique des fibres de collagène. L'examen histologique de cette coloration montre une hétérogénéité reflétée par une coloration rouge plus ou moins intense de la plaque de croissance des souris mutées (Figure 47 A).

La MEC située entre les colonnes de chondrocytes (interterritoriales) contient des fibrilles de collagène qui sont en grande partie parallèles les unes aux autres et qui joueraient un rôle contraignant les chondrocytes à se mettre en colonnes. Afin d'évaluer l'organisation du collagène dans la plaque de croissance de souris cKO, une microscopie SHG (Second Harmonic Generation) a été utilisée. Les données ont révélé de nettes différences dans l'orientation des fibres de collagène entre la plaque de croissance des souris WT et cKO (Figure 47 B). Alors que les fibrilles de collagène sont parallèles les unes aux autres chez les souris WT, elles sont plus abondantes et orientées de manière aléatoire chez les souris cKO (Figure 47 B), suggérant une altération profonde de l'organisation des fibrilles de collagène intercolumnaires. Ces données confirment l'idée que l'absence de la XT-I entraîne une perturbation de l'organisation du collagène dans la plaque de croissance.

Ces résultats indiquent que la XT-I joue un rôle essentiel dans la structuration de la MEC et de la fibrillation des collagènes, un processus contrôlé par les PGs.

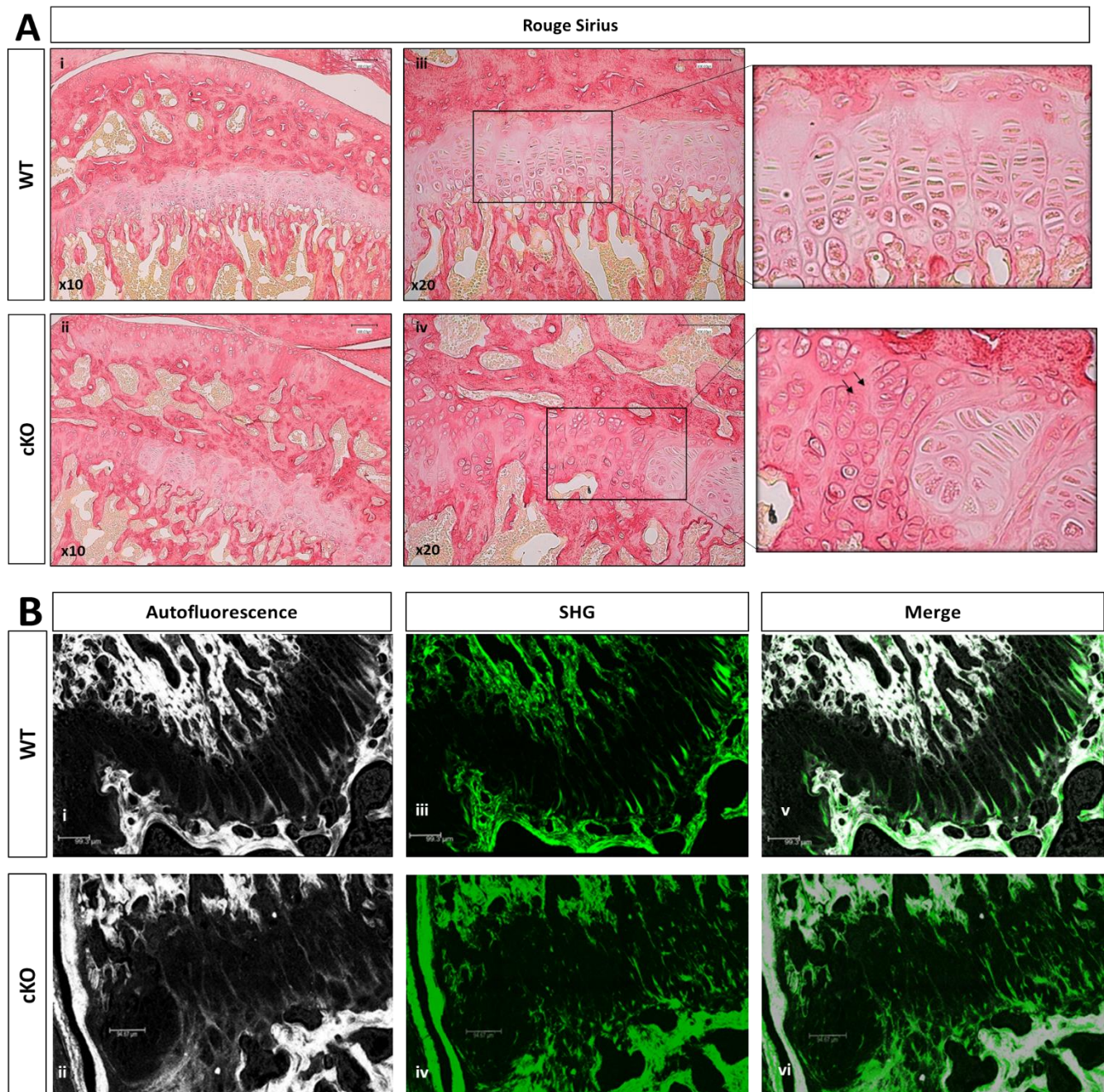


Figure 47 : Analyse des fibres du collagène matricielle de la plaque de croissance chez les souris *Col2a1-CreERTM;XylTI^{flox/flox}* et WT âgées de 8 semaines. **A-** Coloration rouge Sirius des coupes sagittales du tibia. i, ii- Grossissement (x10). iii, iv- Grossissement (x20). Les carrés noirs délimitent une partie agrandie de la plaque de croissance. Les flèches noires indiquent une région riche en collagène chez les souris cKO. Echelle : 100µm. **B-** Images prises par la technologie SHG. Les sections étudiées mesurent 10 µm d'épaisseur. i, ii- Image représentant l'autofluorescence. iii, iv- Image SHG. v, vi- Image fusionnée de celle de collagène et celle des cellules. Échelle : 95 µm.

8. Les souris *Col2a1-CreERTM;XylTI^{flox/flox}* présentent un défaut de maturation des chondrocytes et une augmentation de l'expression des marqueurs ostéogéniques

Afin de déterminer les facteurs et les mécanismes moléculaires responsables des anomalies de développement ostéoarticulaire chez les souris invalidées pour le gène de la XT-I (cKO) nous avons analysé l'expression de plusieurs marqueurs de la chondrogenèse et de la formation osseuse par la technique d'hybridation *In Situ*. Dans un premier temps, nous avons testé l'expression des marqueurs du phénotype chondrocytaire, l'agrécan et le collagène II et le marqueur de l'hypertrophie chondrocytaire, le collagène X (Col10). Cette étude a été réalisée chez les souris âgées de 4 semaines. L'analyse de l'expression de l'agrécan montre une surexpression de sa protéine core (Figure 48 A). Cette surexpression pourrait être due au fait que la déficience en chaînes de GAGs provoquée par l'absence de la XT-I pourrait conduire les chondrocytes à synthétiser plus de protéines core afin de compenser cette déficience en GAGs. Dans le cas du collagène II, l'analyse montre une surexpression de ce gène chez les souris mutées. Une augmentation de l'expression des ARNm du collagène pourrait être due à une maturation avancée des chondrocytes chez les souris mutées. Dans le cas du collagène X, son expression est également augmentée au même titre que l'agrécan et le collagène II, mais son domaine d'expression est réduit chez les souris mutées, indiquant que la zone d'hypertrophie est moins large chez les souris cKO par rapport aux souris sauvages (Figure 48 A). De plus, l'expression de la MMP13, métalloprotéase impliquée dans la dégradation de la matrice cartilagineuse, montre une augmentation au niveau de la zone hypertrophique mais son domaine d'expression est réduit (Figure 48 B).

Nous avons par la suite étudié les marqueurs de l'ostéoblastogenèse, de la même manière que ceux de la chondrogenèse. L'expression des ARNm de ces marqueurs, en particulier l'ostéocalcine (β -glap) et l'ostéopontine (Spp1), est augmentée significativement chez les souris cKO âgées de 4 semaines (Figure 49) et de 10 jours (Figure 50 B). Concernant l'ostéopontine, son expression est très importante au niveau des cellules de la jonction chondro-osseuse. Nous avons également analysé l'expression d'Ihh sécrété au niveau de la zone pré-hypertrophique et du collagène X, marqueur d'hypertrophie. Cette analyse montre une surexpression de ces deux facteurs chez les souris mutées. L'augmentation de l'expression de tous ces marqueurs confirme à son tour une accélération de la différenciation terminale des chondrocytes hypertrophiques, une activité ostéoblastique importante et une accélération du processus d'ossification chez les souris mutées. En plus d'être un marqueur d'ostéogenèse, l'ostéopontine est considérée comme un régulateur important du remodelage osseux et de la cristallinité minérale, suggérant ainsi que

l'augmentation de l'expression de l'ostéopontine suite à l'inactivation du gène *XylTI* pourrait conduire à une accélération de l'ossification accompagnée d'un remodelage osseux.

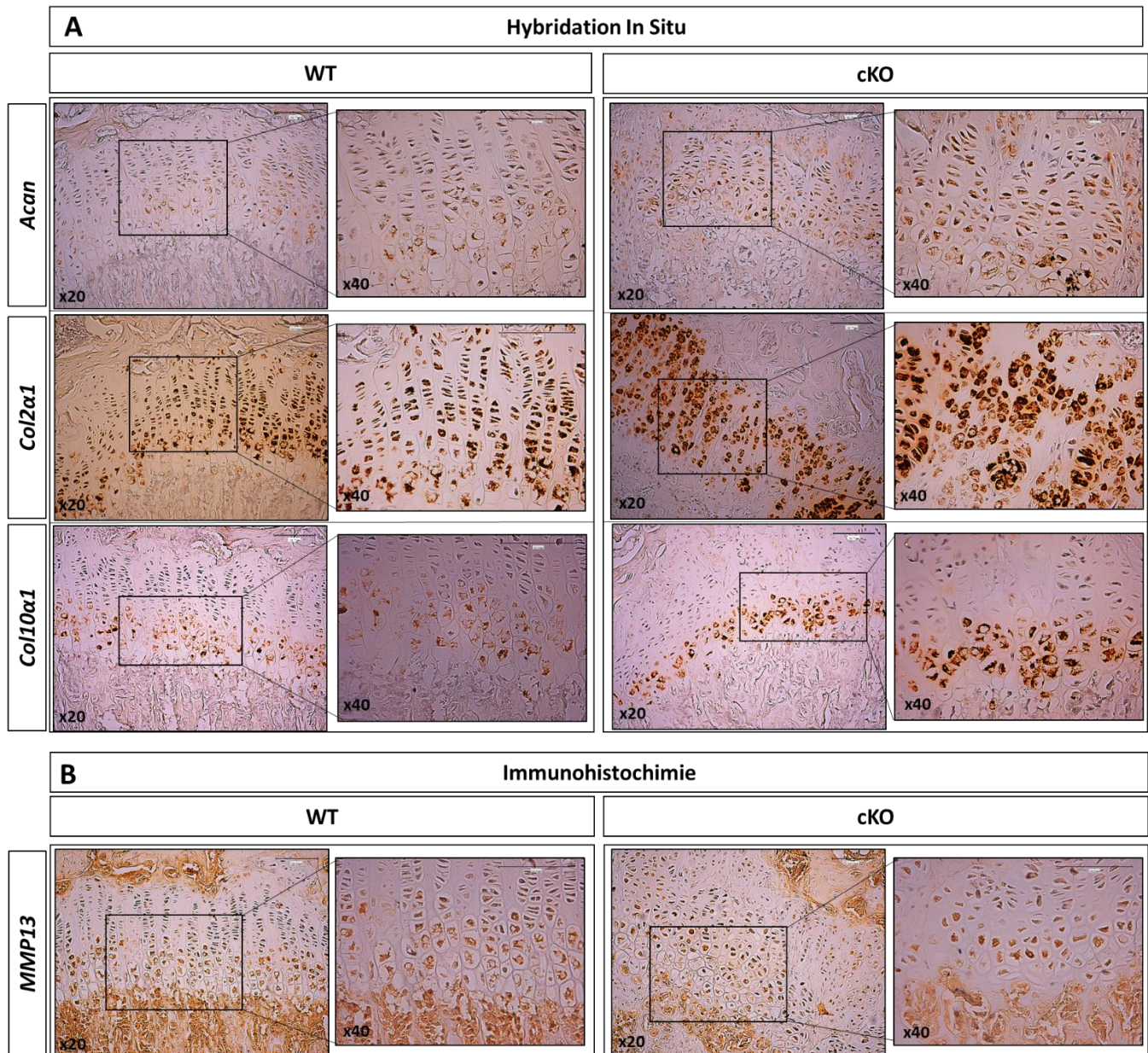


Figure 48 : Analyse de l'expression des gènes de la chondrogenèse et de la MMP13 chez les souris âgées de 4 semaines. **A-** Analyse de l'expression des ARNm de l'agrécane (*Acan*), du collagène II (*Col2 α 1*) et du collagène X (*Col10*) chez les souris sauvages (*WT*) et les souris mutées (*cKO*) par hybridation *In Situ*. **B-** Analyse de l'expression de la MMP13 par immunohistochimie. Échelle : 100 μ m.

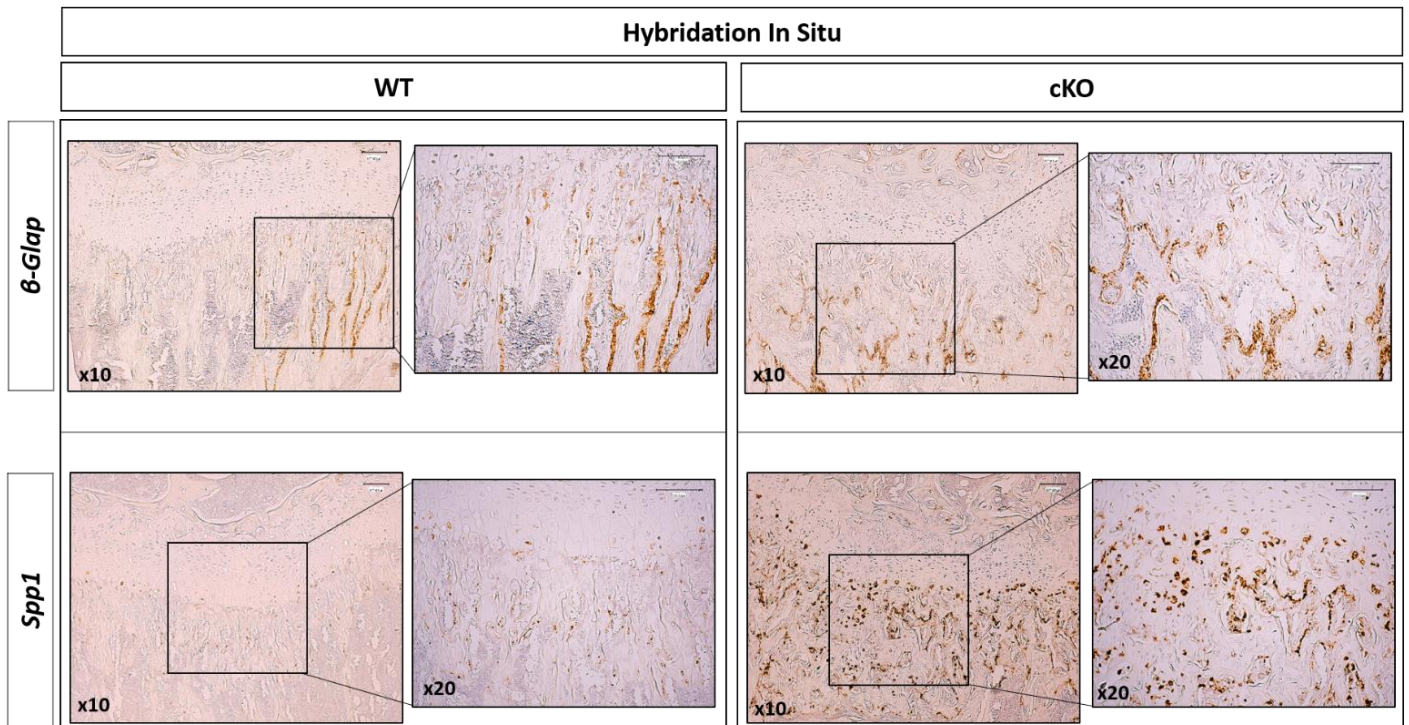


Figure 49 : Analyse de l'expression des gènes spécifiques de l'ossification chez les souris âgées de 4 semaines. *Etude de l'expression de l'ostéocalcine (β -Glap) et de l'ostéopontine (Spp1) par hybridation In Situ chez les souris sauvages (WT) et mutées (cKO). Échelle : 100 μ m.*

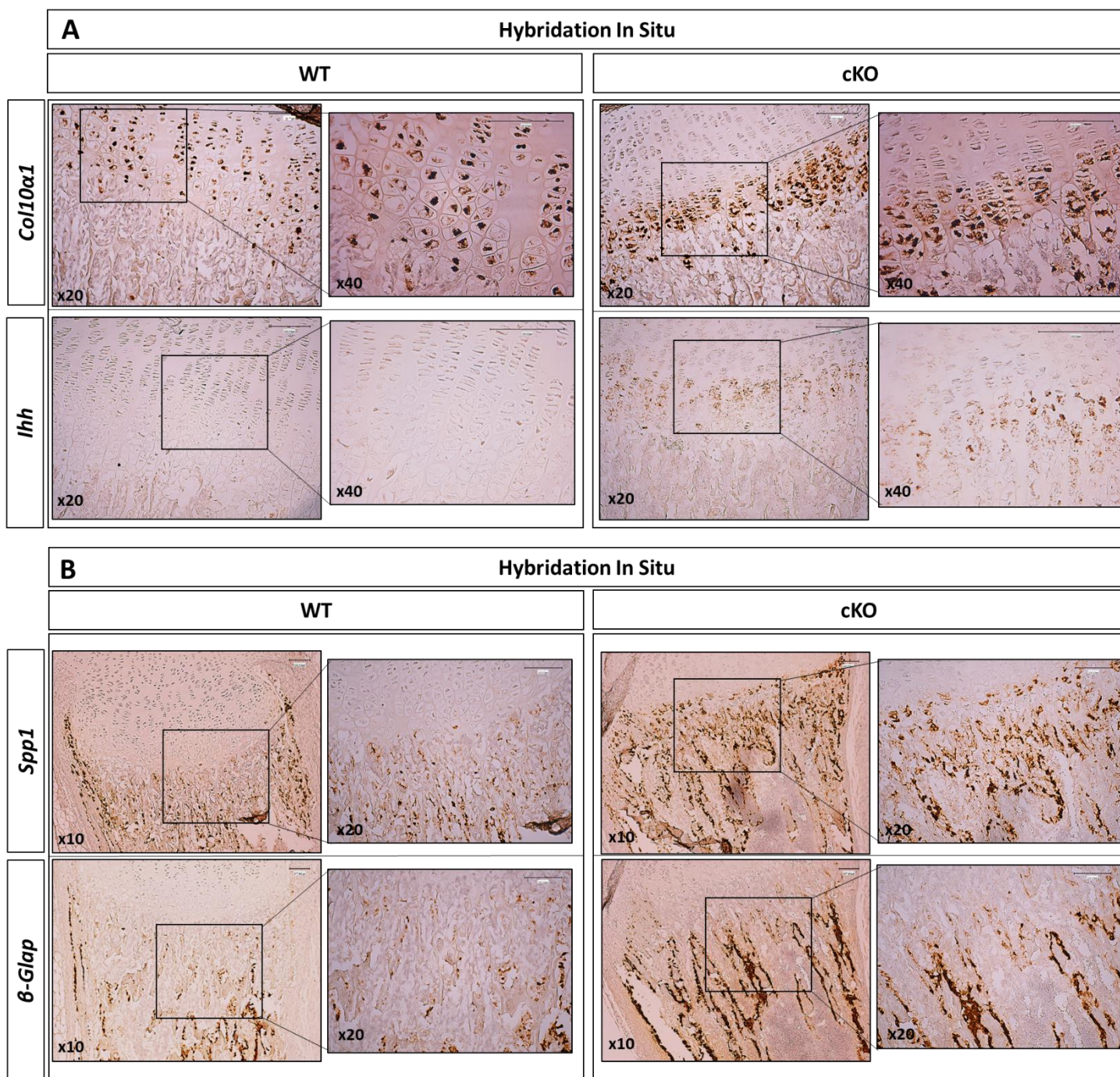


Figure 50 : Analyse de l'expression des gènes spécifiques de la différenciation hypertrophique et de l'ossification chez les souris âgées de 10 jours. *A-* Analyse de l'expression du collagène X et d'*Ihh* par hybridation In Situ. *B-* Etude de l'expression de l'ostéocalcine (β -*Glap*) et de l'ostéopontine (*Spp1*) par hybridation In Situ chez les souris sauvages (WT) et mutées (cKO). Échelle : 100 μ m.

9. L'implication de la voie de signalisation du TGF- β dans le nanisme, les défauts de chondrogenèse et d'ossification chez les souris *Col2a1-CreERTM;XylT1^{flox/flox}*

Afin d'explorer les mécanismes moléculaires par lesquels la déficience en *XylT1* pourrait entraîner un nanisme et des anomalies osseuses, nous avons analysé la voie du TGF- β qui joue avec d'autres facteurs un rôle majeur dans le développement ostéoarticulaire (Wu et al., 2016). La figure 51 illustre les différentes voies de signalisation du TGF- β . Nous avons décidé d'analyser l'expression des deux récepteurs du TGF β (TGF β R2 et TGF β R3) par immunohistochimie chez les souris sauvages et mutées âgées de 10 jours.

Les souris cKO âgées de 10 jours montrent une surexpression importante de l'expression du récepteur TGF β R2 par rapport aux souris sauvages et plus particulièrement au niveau de la zone proliférative, de la zone du repos et de la surface articulaire (Figure 52 A). Les mêmes résultats sont observés pour le récepteur TGF β R3 (Figure 53). De plus, l'analyse du pSmad2 (transducteur du signal des récepteurs du TGF- β) montre une surexpression chez les souris mutées (Figure 52 B). Au vu de ces résultats et des études précédentes, nous pouvons suggérer que l'effet de la déficience en XT-I sur la chondrogenèse et l'ossification endochondrale pourrait être due à une dérégulation (une activation) de la voie de signalisation du TGF- β .

Afin de déterminer l'impact de la dérégulation du TGF- β sur le nanisme des souris cKO, des souris cKO et WT ont été injectées avec un inhibiteur du TGF β R1 afin d'invalider la signalisation du TGF- β . Les souris *Col2a1-CreERTM;XylT1^{flox/flox}* ont été séparées en quatre groupes : G1 contrôle (WT injectée avec l'huile de maïs), G2 (WT injectée avec l'inhibiteur du TGF- β), G3 (cKO injectée avec le tamoxifène) et G4 (cKO injectée avec le tamoxifène et l'inhibiteur du TGF- β) (Figure 54 A). Le suivi hebdomadaire de ces quatre groupes a permis de montrer une récupération d'environ 5.9% pour les souris déficientes en XT-I mais traitées par l'inhibiteur du TGF- β (Figure 54 B). Ce résultat suggère l'implication du TGF- β dans le nanisme observé chez les souris mutées.

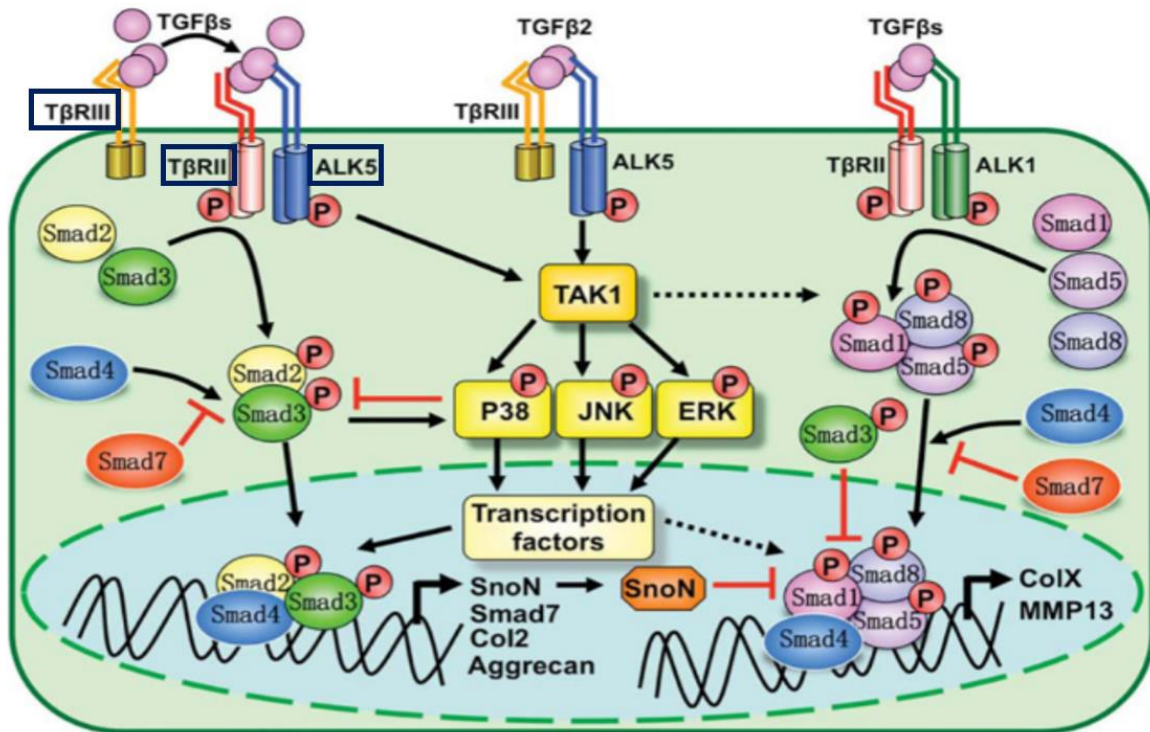


Figure 51 : Les voies de signalisation canoniques et non canoniques du TGF-β impliquées dans la formation du cartilage et son maintien (Wang et al., 2014).

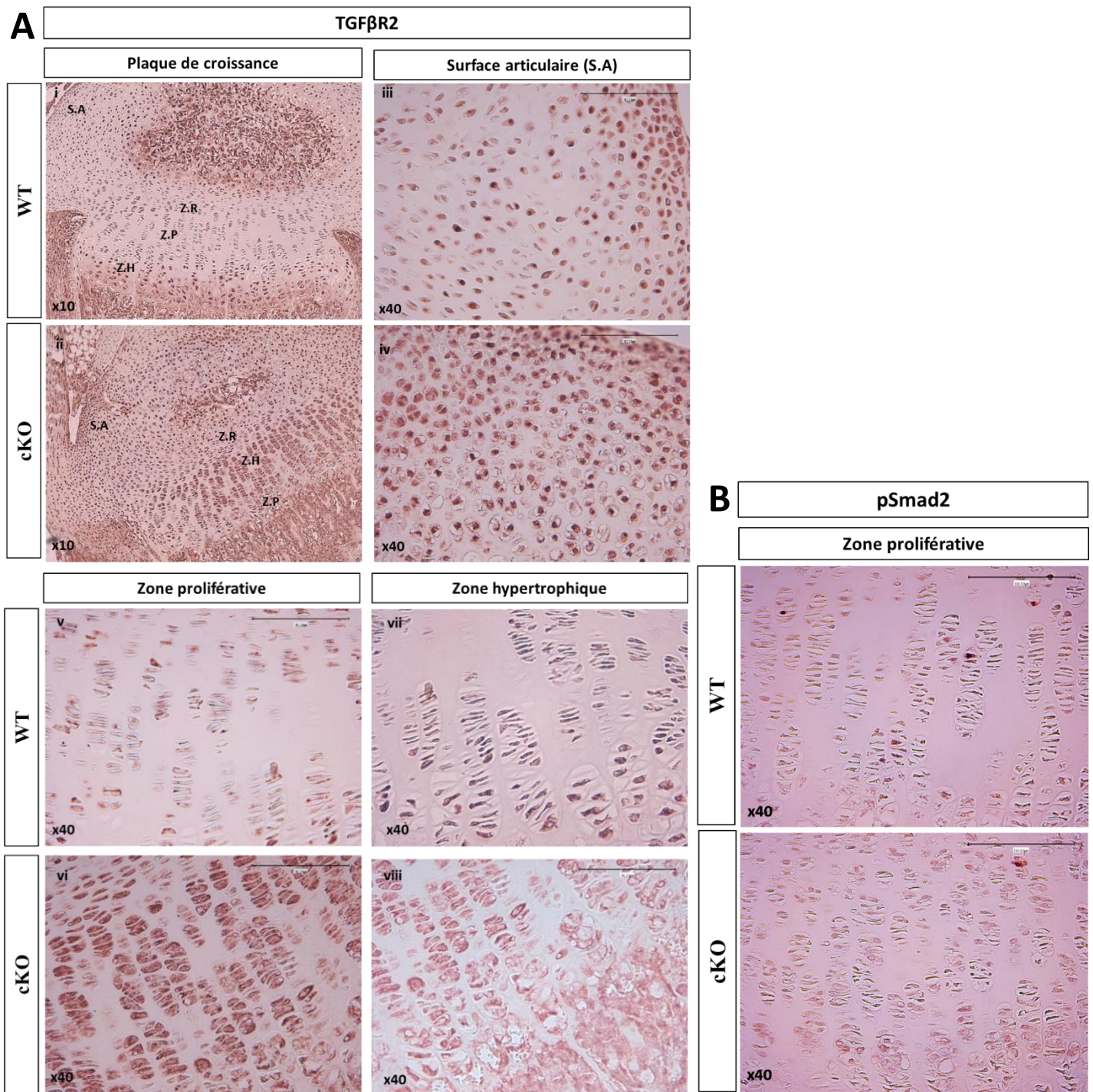


Figure 52 : Analyse par immunohistochimie de l'expression du récepteur TGF β R2 et du pSmad2 au niveau du tibia des souris âgées de 10 jours. A- Etude de l'expression du TGF β R2 à l'âge de 10 jours au niveau de la surface articulaire (iii, iv), de la zone proliférative (v, vi) et de la zone hypertrophique (vii, viii). Z.R : Zone de repos. B- Etude de l'expression de pSmad2. Échelle : 100 μ m.

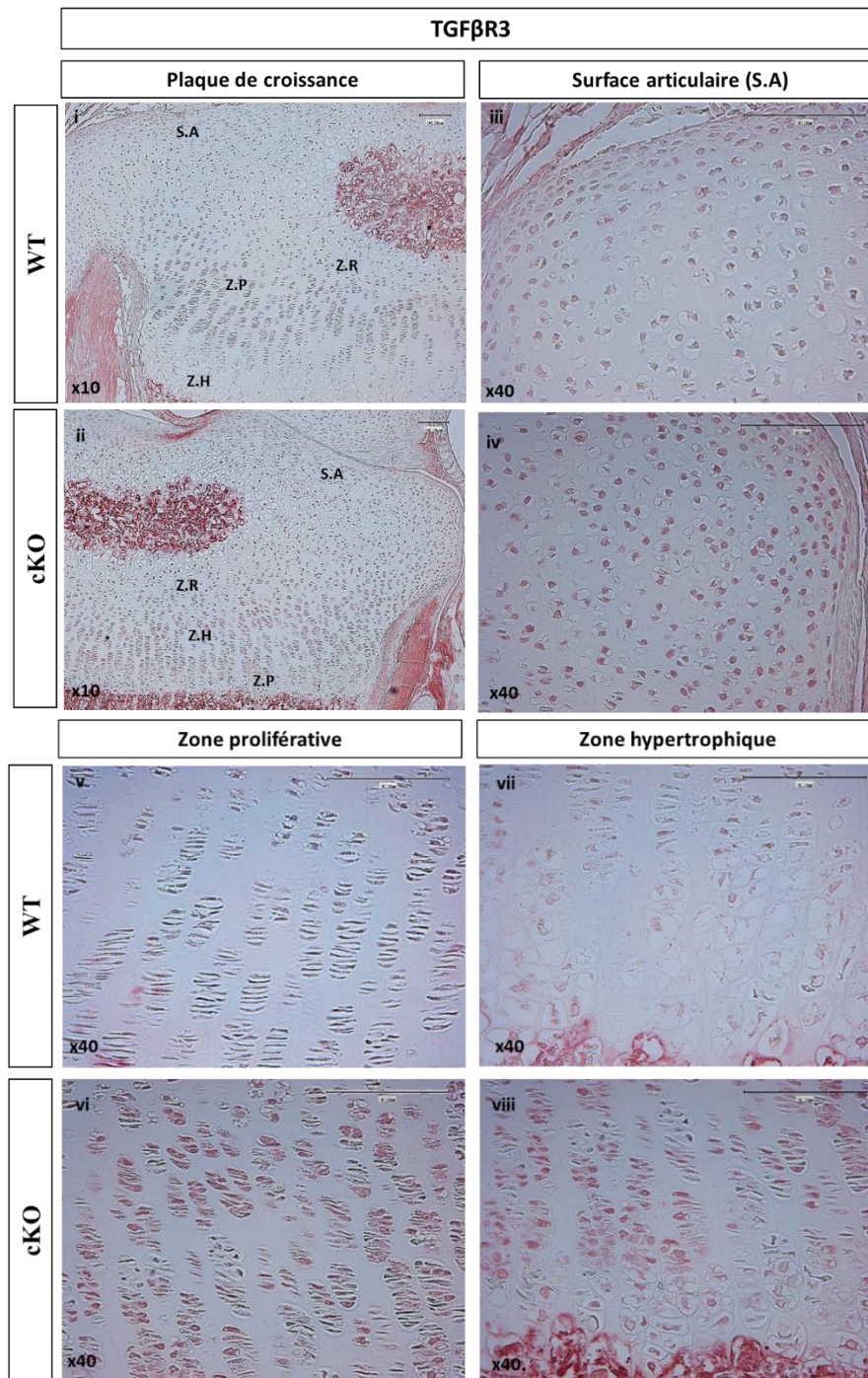


Figure 53 : Analyse par immunohistochimie de l'expression des récepteurs TGF β R3 au niveau du tibia des souris âgées de 10 jours. *Etude de l'expression du TGF β R3 à l'âge de 10 jours au niveau de la surface articulaire (iii, iv), de la zone proliférative (v, vi) et de la zone hypertrophique (vii, viii). Échelle : 100 μ m.*

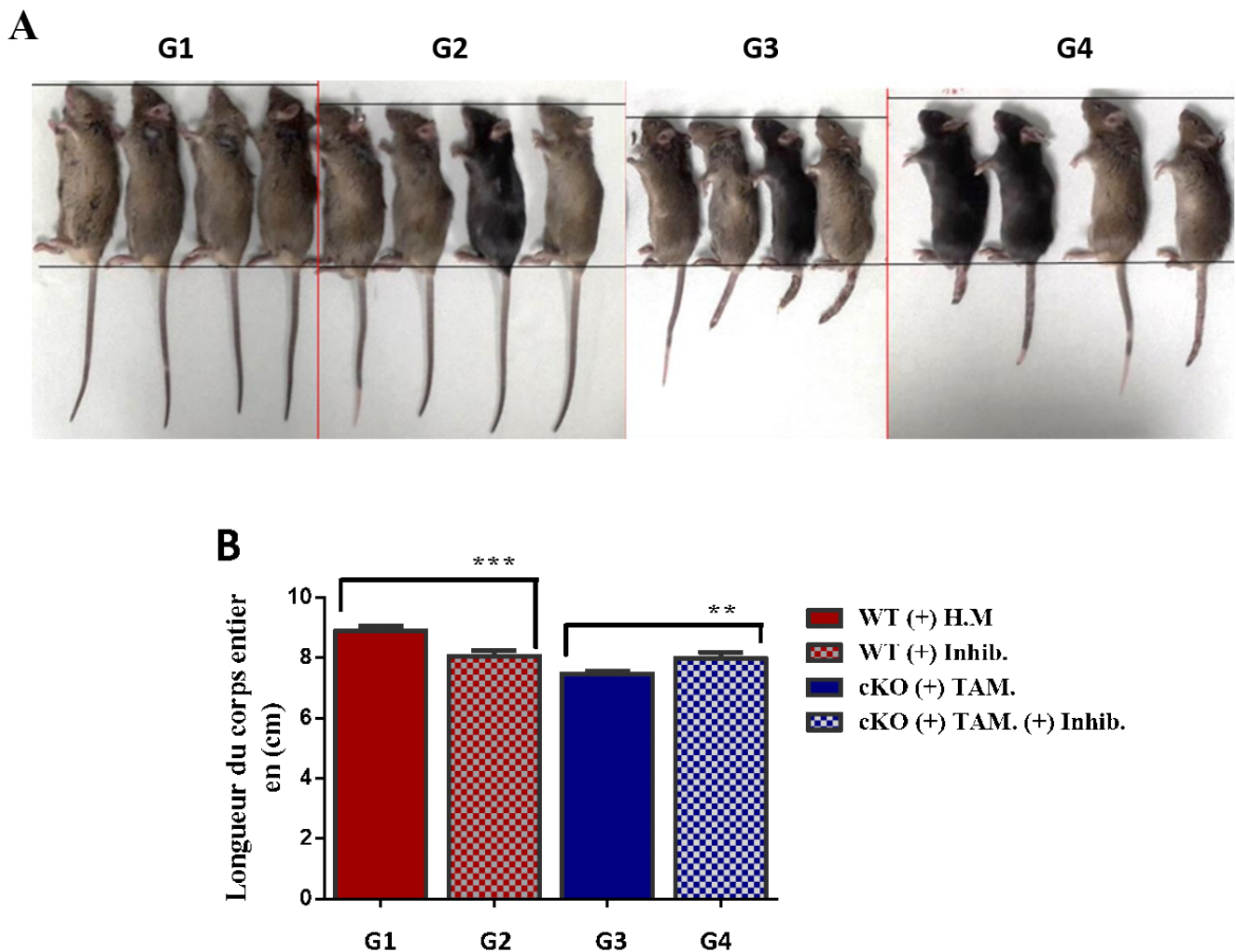


Figure 54 : Etude de l'effet d'injection de l'inhibiteur du TGF β R1 chez les souris cKO. Les injections hebdomadaires ont été réalisées 4 fois dès la première semaine de la vie postnatale. Les souris ont été sacrifiées à l'âge de 8 semaines. **A-** Image illustrant les tailles des différents groupes étudiés, formé chacun de 4 souris ; G1 : souris injectées par l'huile de maïs (H.M^o), G2 : souris injectées par l'huile de maïs et l'inhibiteur du TGF β R1 (Inhib.), G3 : souris injectées par le tamoxifène (TAM), G4 : souris injectées par le tamoxifène et l'inhibiteur du TGF β R1. **B-** Graphe représentant la moyenne des longueurs du corps entier des différents souris de chaque groupe, mesurée en cm. La significativité statistique est évaluée en utilisant oneway ANOVA. $p < 0,01$ (**) ou $p < 0,001$ (***)

10. Dérégulation de la voie de signalisation des Wnts chez les souris *Col2a1-*

CreERTM;XylT1^{flox/flox}

WNT constitue une famille de glycoprotéines secrétées, impliquées dans le développement, la croissance et l'homéostasie de différents tissus et organes parmi lesquels l'os et le cartilage. Il a été reporté que cette famille de ligands joue un rôle crucial dans le développement ostéoarticulaire. Des études menées sur *Wnt4* ont montré son implication dans la formation du cartilage articulaire. En effet, la surexpression du *Wnt4* durant la chondrogenèse provoque un raccourcissement des os longs, un élargissement de la zone hypertrophique, et un retard du processus d'ossification endochondrale (Lee and Behringer, 2007). D'autre part, des études menées sur le rôle de *Wnt4* ont montré sa capacité à favoriser la différenciation des ostéoblastes ainsi que la formation des os *in vivo* et *in vitro* (Chang et al., 2007 ; Yu et al., 2014). Il a été également montré que *Wnt5b* stimule la différenciation chondrocytaire en favorisant la transition des chondrocytes de repos vers les chondrocytes prolifératifs (Figure 55) (Ma et al., 2013). De plus, il favorise le maintien de la prolifération chondrocytaire et inhibe l'hypertrophie (Yang et al., 2003). En ce qui concerne la localisation et le lieu d'expression de ces molécules, il a été démontré que *Wnt4* est exprimé au niveau du cartilage articulaire, des cellules hypertrophiques de la plaque de croissance et les cellules mésenchymateuses, alors que *Wnt5b* est exprimé au niveau de la zone préhypertrophique et hypertrophique de la plaque de croissance (Andrade et al., 2007 ; Church, 2002).

Vue l'importance de ces deux facteurs dans la chondrogenèse et l'ossification endochondrale, nous avons étudié leur niveau d'expression dans la plaque de croissance des souris sauvages et mutées âgées de 10 jours. Les résultats montrent une surexpression de ces deux ligands (*Wnt4* et *Wnt5b*) dans la plaque de croissance des souris mutées (Figure 56) surtout au niveau de la zone proliférative et de la surface articulaire (Figure 56 A, B iv, vi), alors que cette expression est plus localisée au niveau de la zone hypertrophique et articulaire chez les souris WT (Figure 56 A, B iii, v). Cette localisation perturbée de ces deux médiateurs chez les souris cKO, pourrait entraîner un dysfonctionnement des chondrocytes prolifératifs dans la plaque de croissance.

Ces résultats suggèrent un effet de la délétion de XT-I sur la voie de signalisation de Wnt qui à son tour pourrait engendrer des défauts de chondrogenèse et d'ossification endochondrale.

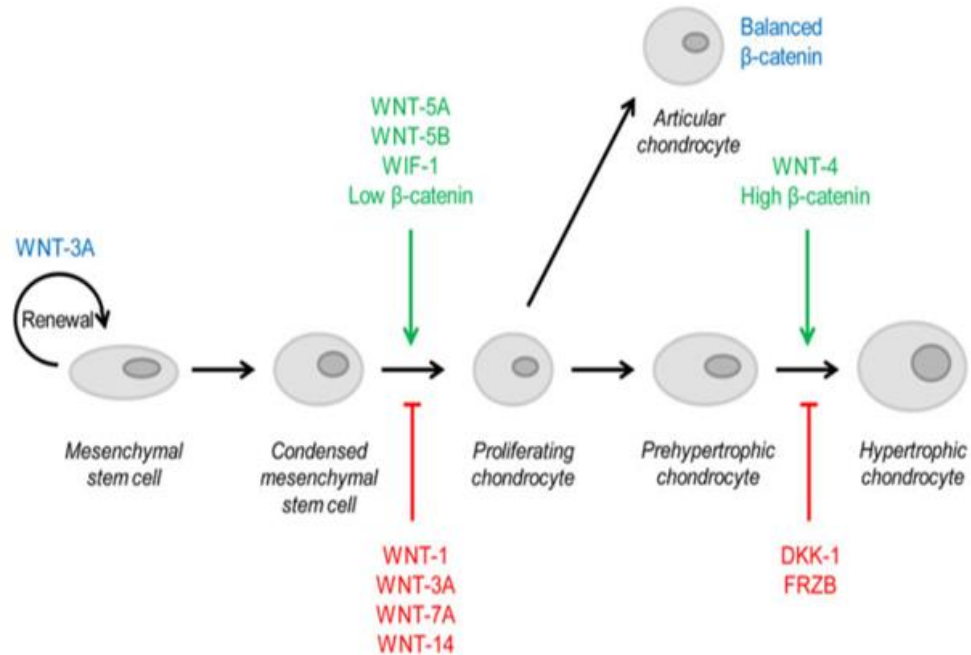


Figure 55 : Implication de la voie de signalisation de WNT dans la chondrogenèse. *WNT-3A* induit la prolifération et le renouvellement sélectif des MSC qui forment des condensations mésenchymateuses au stade initial de la différenciation. Par la suite, la différenciation des chondrocytes est induite par de faibles taux de β -caténine, *WNT-5A*, *WNT-5B* et *WIF-1*, tandis que *WNT-1*, *WNT-3A*, *WNT-7A* et *WNT-14* bloquent la différenciation des chondrocytes. Dans le cartilage articulaire adulte, un équilibre délicat des taux de β -caténine est impliqué dans le maintien du phénotype des chondrocytes. La différenciation hypertrophique des chondrocytes est induite par *WNT-4* et des niveaux élevés de β -caténine et bloquée par les antagonistes de WNT *DKK-1* et *FRZB* (Ma et al., 2013).

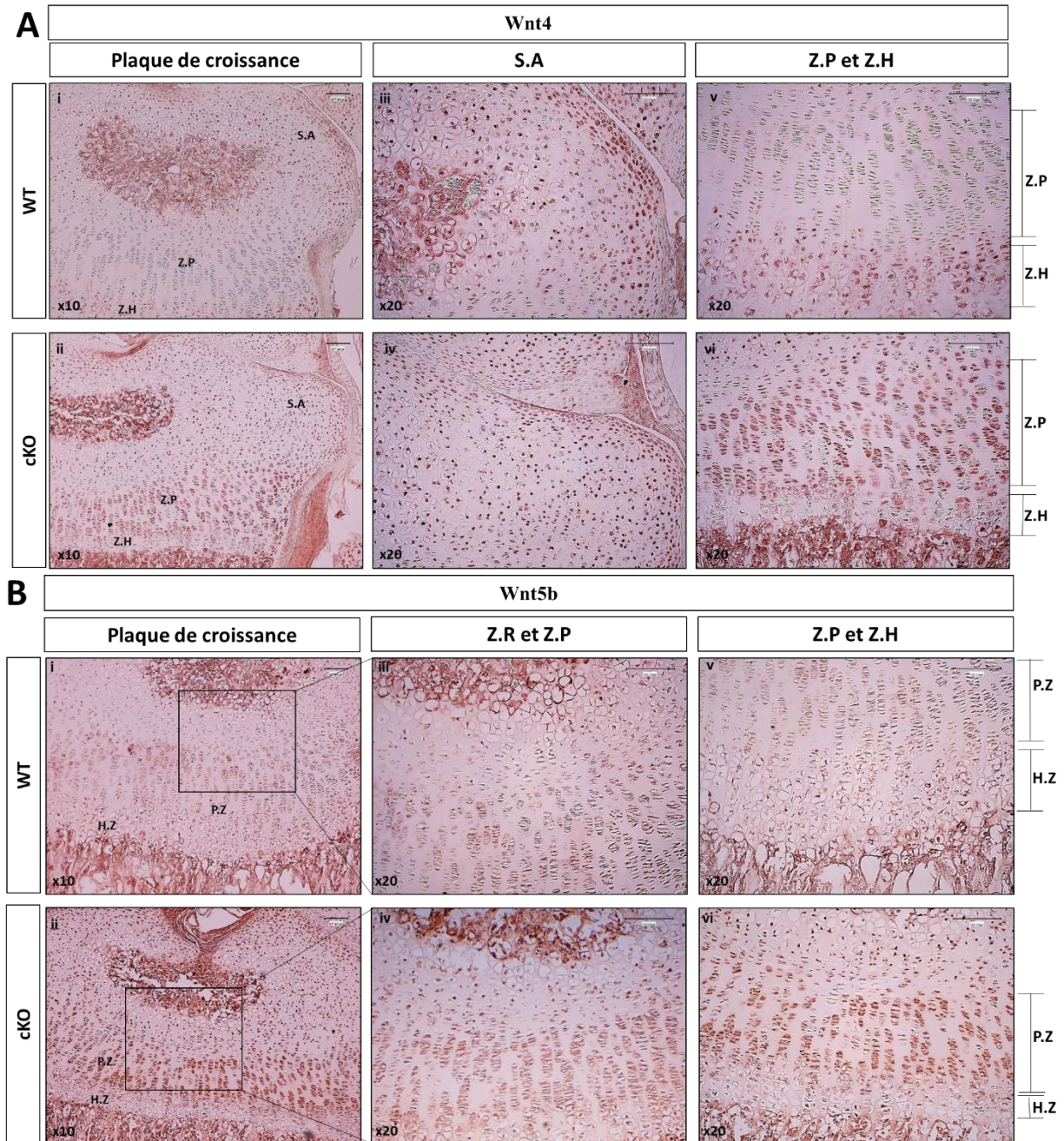


Figure 56 : Analyse de l'expression de Wnt4 et Wnt5b au niveau du tibia des souris cKO et WT âgées de 10 jours par immunohistochimie. *A-* Etude de l'expression du Wnt4 au niveau de la plaque de croissance (i, ii) au niveau de la surface articulaire (S.A) (iii, iv) et des zones proliférative (Z.P) et hypertrophique (Z.H) (v, vi). *B-* Etude de l'expression du Wnt5b au niveau de la plaque de croissance (i, ii) au niveau des zones de repos (Z.R), proliférative (Z.P) (iii, iv) et hypertrophique (Z.H) (v, vi). Echelle : 100µm.

11. Impact de l'inactivation du gène *XylT1* sur l'activité des ostéoblastes dérivés des os longs

La déficience en XT-1 suite à une inactivation conditionnelle par injection avec du tamoxifène avait des répercussions non seulement sur la maturation des chondrocytes mais aussi sur le phénomène d'ossification endochondrale chez les souris mutées. C'est ainsi que nous avons montré une accélération de l'ossification endochondrale, une activité importante des ostéoblastes et un épaississement de l'os cortical et des trabécules chez les souris cKO, suggérant ainsi un dépôt important de la matrice osseuse, constituée principalement du collagène de type I (Col1). Celui-ci forme un modèle dynamique et instructif pour le dépôt de polymorphes de phosphate de calcium et leur transformation ultérieure en cristaux d'hydroxyapatite cristallins. En addition, des études récentes ont montré que les chondrocytes ont la capacité de se différencier en ostéoblastes. L'ensemble de ces informations suggèrent que la déficience en XT-I au niveau des chondrocytes pourraient avoir des effets sur l'activité des ostéoblastes. Pour cela, nous avons étudié l'expression de certains composants de la MEC osseuse ; le Col1, la *Spp1* (OPN), la DMP1 (Dentin-matrix protein 1) et la MEPE (Matrix extracellular phosphoglycoprotein) et l'expression de l'osterix (*Osx*, facteur de transcription) exprimé au niveau des ostéoblastes immatures et qui favorise l'expression du collagène de type I de l'ostéopontine et d'autres composants de la matrice osseuse. DMP1 et MEPE sont reconnus comme des inhibiteurs de la formation des cristaux d'hydroxyapatite au niveau de la matrice osseuse (Staines et al., 2012). Les résultats ont montré une surexpression du Col1 et de l'OPN et de l'osterix, alors que l'expression de la DMP1 et de la MEPE a été diminuée chez les souris mutées (Figure 57). De plus, nous avons analysé deux voies de signalisation, pERK et β -caténine qui pourraient être impliquées dans les différences d'expression de ces composants matriciels. L'analyse protéique par western blot montre une surexpression de ces deux voies de signalisation chez les souris mutées (Figure 58).

L'ensemble de ces résultats suggèrent que la déficience en XT-I au niveau des chondrocytes admet un effet sur l'activité des ostéoblastes en perturbant des voies de signalisation telles que la voie de Wnts impliquée dans la régulation de l'expression des composants de la matrice osseuse.

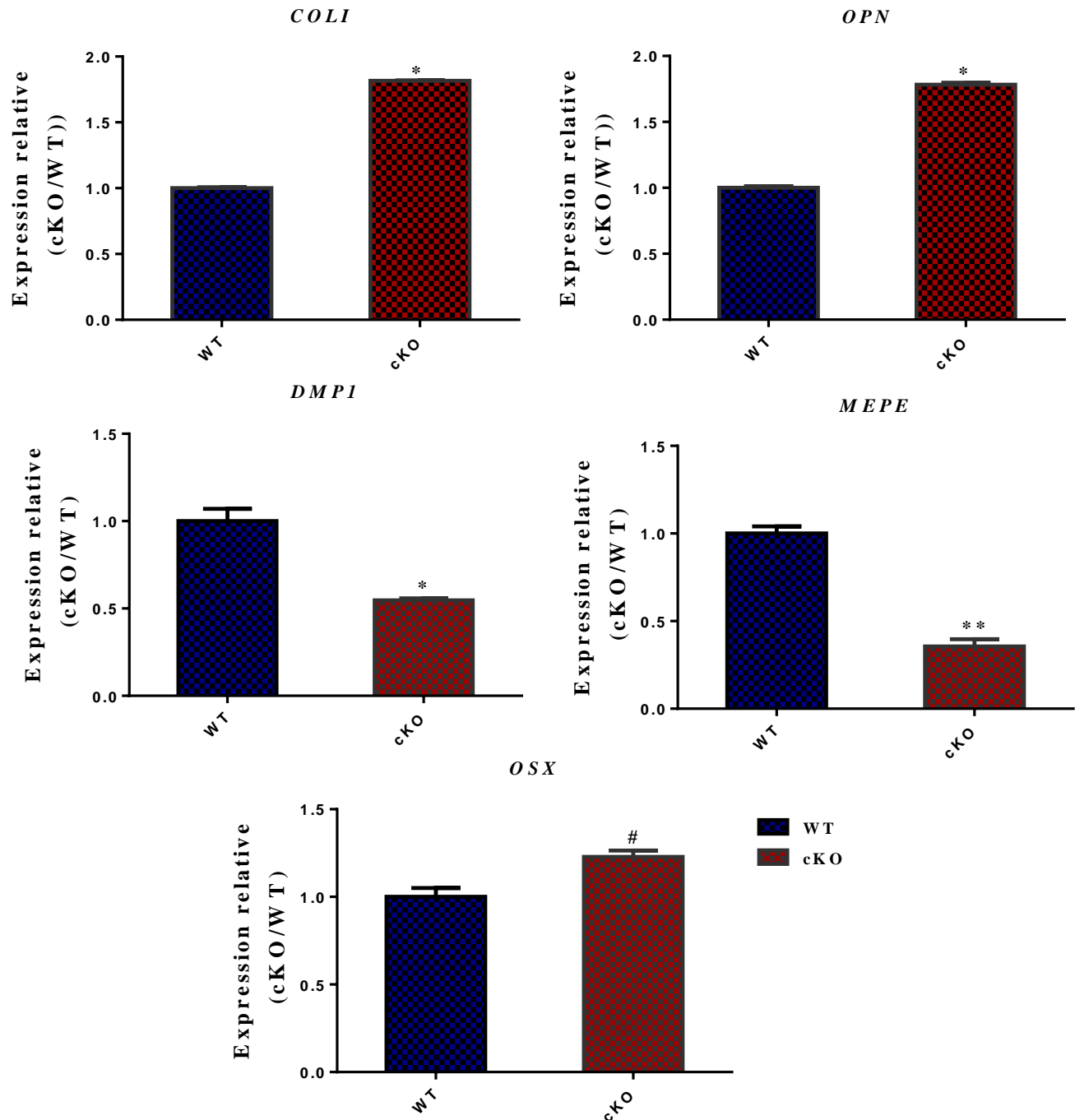


Figure 57 : Effet de l'inactivation de la *Xylt1* sur l'activité des ostéoblastes. Taux d'expression des ARNm des marqueurs ostéogéniques : *Col1*, *OPN*, *DMP1*, *MEPE* et *Osx* déterminé par RT-qPCR en temps réel. Les valeurs sont normalisées de sorte que les mesures de WT sont définies comme étant égale à 1. Le taux d'expression de chaque gène est normalisé par rapport aux gènes rapporteurs *S29* et *Gapdh*. La significativité statistique est évaluée en utilisant le t-test, $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), # : non significative.

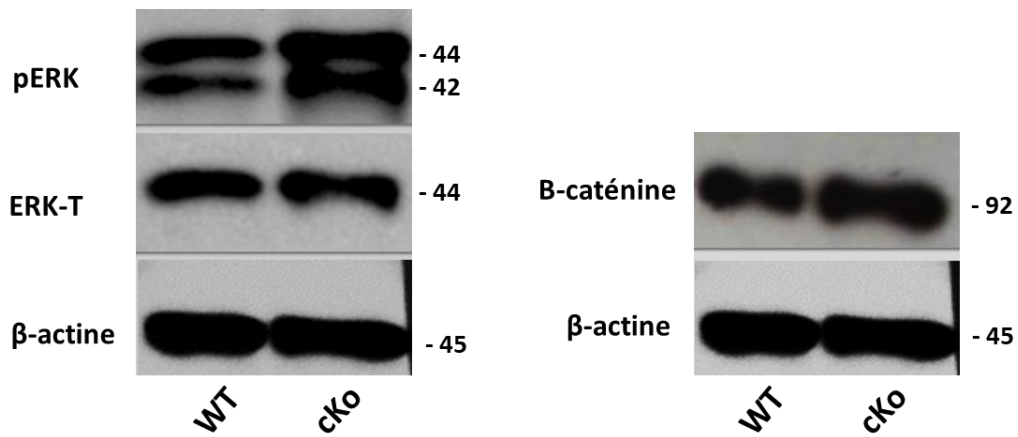


Figure 58 : Dérégulation de la voie de signalisation de WNT chez les ostéoblastes des souris mutées. *Taux d'expression protéique du pERK et de la β-caténine réalisé par Western Blot, et normalisé par rapport au gène rapporteur β-actine.*

DISCUSSION

La XT-I est une enzyme appartenant à la famille des xylosyltransférases. Elle joue un rôle clé dans la biosynthèse des PGs en catalysant la première étape d'assemblage des chaînes de GAGs. Cette étape est l'étape limitante dans la synthèse des PGs. Il a été rapporté que la XT-I est impliquée dans le développement squelettique et dans de nombreuses pathologies et syndromes, comme le syndrome de dysplasies Desbuquois de type 2 (DBQD2) (Bui et al., 2014 ; Jamsheer et al., 2016 ; Guo et al., 2017 ; Al-Jezawi et al., 2017) et le Pseudoxanthoma elasticum (PXE) (Götting et al., 2005). En outre, des études sur la XT-I chez des poissons Zèbres ont montré l'implication de cette enzyme dans la production de la matrice cartilagineuse et la synchronisation du développement squelettique (Eames et al., 2011). En 2014, Mis et al. ont étudié des souris mutées au niveau du gène de la XT-I entraînant une diminution de son activité. Cette étude a montré des anomalies du développement squelettique chez ces souris (Mis et al., 2014). Cependant, les mécanismes moléculaires responsables des anomalies observées ne sont pas encore élucidés. Afin d'élucider le rôle de la XT-I au cours du développement, nous avons généré une souris *Col2a1-CreERTM;XylT1^{flox/flox}*, permettant l'inactivation du gène *XylT1* au niveau du cartilage.

Défauts squelettiques des souris déficientes en XT-I

En premier lieu, nous avons étudié le phénotype des souris sauvages et mutées par un suivi hebdomadaire de leur croissance. Cette étude a montré une chute du poids des souris mutées et a révélé une réduction de la longueur du corps d'environ 20%. Afin de vérifier que ce phénotype est dû à la délétion de la *XylT1*, nous avons injectés ou non des souris *Col2a1-CreERTM* dont la *XylT1* n'est pas floxé avec le tamoxifène. Aucun effet du tamoxifène sur le phénotype des souris n'a été observé indiquant que les changements morphologiques observés chez les souris cKO sont la conséquence de l'inactivation du gène de la XT-I.

L'examen histologique du squelette des souris a permis de révéler de nombreuses anomalies squelettiques parmi lesquelles : un raccourcissement des membres et des phalanges, une réduction de la partie cartilagineuse de la colonne vertébrale et de la taille du crâne et un élargissement des côtes. Ces résultats sont similaires à ceux observés chez les souris *pug* ayant une diminution de l'activité de la XT-I (Mis et al., 2014) et confirment le nanisme observé dans les études cliniques menées sur des patients ayant des mutations au niveau du gène de la XT-I.

Ossification de la trachée des souris déficientes en XT-I

Nous avons analysé la trachée qui est un organe complexe, faisant partie du système respiratoire. Elle est formée de trois types de tissus, la muqueuse trachéale, des fibres musculaires lisses et le cartilage trachéal de type hyalin possédant des caractéristiques spécifiques qui lui confèrent des propriétés uniques. Contrairement aux chondrocytes de la plaque de croissance qui sont remplacés progressivement par des tissus minéralisés, les chondrocytes de la trachée ne s'engagent pas dans un processus de maturation. De ce fait, cette structure cartilagineuse persiste tout le long de la vie comme étant un cartilage permanent. En revanche, des études réalisées sur l'homme ont reporté une minéralisation de la trachée dans certaines pathologies. En effet, il a été montré chez des sujets sous traitement prolongé de Wafarin-sodium, un anticoagulant prophylactique, une calcification de la trachée (Moncada et al., 1992). De plus, la calcification de la trachée a été observée chez une patiente âgée de 92 ans souffrant d'une insuffisance cardiaque congestive aggravée par une fibrillation auriculaire non contrôlée (Jo et al., 2008) et chez des patients atteints de Trachéobronchopathie ostéochondroplastique (Chung et al., 2011). En ce qui concerne l'effet des PGs sur la structure et la fonctionnalité de la trachée, des travaux ont montré que des modifications de la structure des PGs et de leur distribution dans la trachée pourraient contribuer à des modifications de la biomécanique du cartilage (Roberts and Paré, 1991). De plus, l'implication de l'agrécane dans le problème d'effondrement trachéale et la léthalité embryonnaire a été montré chez un modèle de souris *knockout* pour l'agrécane (Lauing et al., 2014). Notre étude phénotypique a montré, pour la première fois, une ossification de la trachée chez les souris mutées âgées d'un mois, où le cartilage était ossifié avec une réduction du contenu cartilagineux, suggérant ainsi des problèmes respiratoires. Cette ossification pourrait être liée à une déficience de synthèse des PGs et une ossification du cartilage suite à l'absence de la XT-I. Ce résultat nécessite d'être confirmé en analysant les souris à différents âges, en réalisant des coupes histologiques et en analysant les marqueurs spécifiques de l'os et du cartilage. Une deuxième idée qui semble intéressante, qui découle de la relation entre la minéralisation de la trachée et l'âge chez l'homme, serait d'étudier le processus de vieillissement chez ces souris qui pourraient présenter des signes de vieillissement précoce par rapport aux souris sauvages.

Défauts structuraux au niveau des os longs associés à l'inactivation du gène *Xylt1*

Des défauts de développement du squelette peuvent affecter la taille et la morphologie des os, mais également la structure et la résistance de ces éléments tout au long de la vie de l'organisme. Après avoir analysé le phénotype du squelette des souris déficientes en XT-I et détecté des différences morphologiques

touchant les éléments squelettiques, il était important d'analyser plus en détail les os afin d'identifier de potentiels défauts structuraux qui seraient associées à des pathologies osseuses. Ces dernières peuvent être de plusieurs types, telles que l'ostéoporose, l'ostéopénie, l'ostéopétrose et l'ostéomalacie. Les trois premières maladies sont dues à un déséquilibre de l'homéostasie osseuse et à un défaut du remodelage osseux. Ce dernier est un processus continu qui se produit tout au long de la vie et qui est très important car il permet l'adaptation de la forme et la structure organisée des os aux forces biomécaniques tout en maintenant l'intégrité de l'os et l'homéostasie du calcium et des phosphates. Cet événement étroitement coordonné nécessite les activités synchronisées de plusieurs participants cellulaires pour assurer que la résorption osseuse par les ostéoclastes et la formation par les ostéoblastes se produisent séquentiellement au même endroit anatomique nommé « unité osseuse multicellulaire » pour préserver la masse osseuse (Raggatt and Partridge, 2010). L'ostéoporose (OP) est une maladie systémique caractérisée par une diminution de la masse osseuse et une détérioration microstructurale du tissu osseux, ayant pour conséquence une augmentation de la fragilité et de la susceptibilité à la fracture (Greenblatt et al., 2017). Jusqu'à présent, le diagnostic et l'évaluation des risques de fractures sont basés sur l'analyse quantitative de la masse osseuse (BMD) (Kuo and Chen, 2017). Mais cette évaluation semble insuffisante pour un diagnostic précoce de l'ostéoporose indispensable pour sa prévention et son traitement. Pour cette raison, d'autres techniques performantes parmi lesquelles la mesure des biomarqueurs du remodelage osseux sont en cours de développement (McDonnell et al., 2007 ; Kuo and Chen, 2017). De même que l'ostéoporose, l'ostéopénie est une condition dans laquelle la densité minérale osseuse est inférieure à la normale. De nombreux médecins considèrent qu'il s'agit d'un précurseur de l'ostéoporose. Cependant, toutes les personnes atteintes d'ostéopénie ne développeront pas d'ostéoporose. L'ostéopétrose au contraire est une maladie génétique due à un dysfonctionnement des ostéoclastes et caractérisée par une masse osseuse élevée (Stark and Savarirayan, 2009). L'ostéomalacie est une maladie due à une minéralisation inadéquate des ostéoïdes. Il s'agit principalement de la perte de matière osseuse inorganique, entraînant un ramollissement des os et leur déformation. Les défauts structuraux des os longs induits par la déficience en XT-I ont été analysés par μ CT. Les résultats obtenus ont permis de montrer une réduction du nombre des trabécules et de la densité minérale osseuse (BMD) ainsi qu'une augmentation de l'épaisseur trabéculaire, de l'os cortical et une augmentation du TMD chez les souris cKO âgées de 8 semaines. Non seulement les trabécules et l'os cortical sont affectés chez les souris cKO, mais la tête fémorale semble être plus développée. Dans le but de comprendre les mécanismes responsables de ces défauts chez les souris cKO, il était important d'analyser l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes, les principaux types

cellulaires qui existent au niveau des tissus osseux et qui jouent un rôle essentiel dans le remodelage et l'homéostasie tissulaire. L'activité de l'enzyme Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) a été évaluée sur des coupes histologiques de tibias. Cette activité est augmentée d'une façon remarquable reflétant ainsi une augmentation du nombre des ostéoclastes chez les souris mutées. De plus, nous avons analysé l'expression des marqueurs de la formation osseuse : l'ostéocalcine et l'ostéopontine. Il a été montré que l'ostéopontine est impliquée dans le processus de minéralisation et dans le recrutement des ostéoclastes (Boskey et al., 2002). Également, l'ostéocalcine est impliqué dans le processus de minéralisation (Zoch et al., 2016). L'analyse de l'expression de ces deux marqueurs sur des coupes histologiques des tibias révèle une surexpression au niveau des trabécules et de l'os cortical. De plus, l'ostéopontine et la MMP13, une métalloprotéinase impliquée dans la dégradation de la matrice cartilagineuse et osseuse, montre une expression importante au niveau de l'os et de la zone d'hypertrophie. L'augmentation de l'expression de ces marqueurs suggère un stade d'hypertrophie avancé des chondrocytes, une activité importante des ostéoblastes et une accélération du processus d'ossification endochondrale chez les souris mutées avec probablement un défaut de minéralisation. Par conséquent, cette activité accrue des ostéoblastes et des ostéoclastes montre un remodelage osseux plus important chez les souris mutées. Vue que l'épaisseur trabéculaire ainsi que l'épaisseur corticale sont plus importantes chez les souris cKO, on peut suggérer une activité des ostéoblastes plus importante favorisant ainsi un dépôt accru de la matrice osseuse. En ce qui concerne les autres paramètres histomorphométriques, il n'y avait pas de différences significatives. Ces résultats montrent des défauts structuraux des os et un déséquilibre du remodelage osseux chez les souris cKO. La résorption importante due à une augmentation de l'activité des ostéoclastes et la réduction du BMD pourraient être un signe précoce d'ostéoporose chez les souris cKO déficientes en XT-I. De plus, ces résultats ont mis en évidence des anomalies du développement squelettique et d'ossification non seulement sous sa forme endochondrale mais aussi périostée.

Accélération de la différenciation des chondrocytes hypertrophiques chez les souris mutées

Les os longs des mammifères sont formés par un processus d'ossification endochondrale qui implique la formation d'une ébauche cartilagineuse au sein de laquelle les chondrocytes subissent un processus de maturation avant d'être remplacés par un os mature. Ce processus commence par la condensation et l'agrégation de cellules mésenchymateuses, qui se différencient ensuite en chondrocytes (Shimizu et al., 2007). Au fur et à mesure de la croissance du cartilage, les chondrocytes se rangent en zones morphologiquement distinctes de chondrocytes au repos, proliférants caractérisés par l'expression du

collagène II et de l'agrécan, préhypertrophiques et hypertrophiques caractérisés par l'expression du collagène X, appelés plaques de croissance (Goldring et al., 2006). La progression à travers les plaques de croissance se produit à mesure que les chondrocytes mûrissent, ainsi les cellules les plus matures sont situées près du centre de l'élément squelettique. Alors que les os sont déposés au centre de la gorge par l'invasion des ostéoblastes, l'élément continue de croître aux deux extrémités dans les plaques de croissance via la prolifération hautement régulée d'un sous-ensemble de pool de chondrocytes. Au cours de ce processus, les chondrocytes sécrètent les facteurs nécessaires à la différenciation et à la maturation des ostéoblastes l'Ihh. L'Ihh est exprimé au niveau des chondrocytes préhypertrophiques et au niveau des ostéoblastes chez les souris postnatales (Yang et al., 2015). Il a été montré que la déficience en Ihh favorise le passage des chondrocytes prolifératifs en hypertrophiques alors que cette déficience inhibe la différenciation des ostéoblastes retardant ainsi l'ossification endochondrale (Long and Ornitz, 2013 ; Yang et al., 2015). De plus, il a été montré que la signalisation de l'Ihh est nécessaire dans la formation de l'os cortical (Hojo et al., 2013). Ce dernier se forme à partir du péricondrium où une population de cellules péricondriales se différencie en ostéoblastes contribuant à la formation du collet osseux et par la suite la formation des os corticaux (Colnot et al., 2004). Cette différenciation des ostéoblastes à partir des cellules péricondriales est régulée par l'Ihh. Dans notre modèle de souris, nous avons montré une surexpression d'Ihh, suggérant ainsi son effet sur l'augmentation de la formation de l'os cortical. En ce qui concerne l'os trabéculaire, plusieurs études ont montré que les chondrocytes hypertrophiques peuvent se différencier en ostéoblastes essentiels à la formation de trabécules et qu'ils ont la capacité de se transformer en cellules osseuses lors de fractures du callus (Mirtz et al., 2011 ; Hinton et al., 2017 ; Deng et al., 2018). Ce processus, s'il est mal régulé, conduit à des anomalies squelettiques pouvant affecter la taille, la forme et la résistance des éléments squelettiques (Baldrige et al., 2010). La taille réduite des éléments squelettiques et les défauts structurants observés chez les souris cKO suggèrent que le défaut principal pourrait résider dans le processus de chondrogenèse. Pour cela, nous avons ensuite examiné la structure du cartilage au cours du développement squelettique et de l'ossification endochondrale. Ainsi nous avons observé que la zone hypertrophique est réduite et présente une désorganisation cellulaire. Nous avons également observé une activité importante des ostéoclastes au niveau de la jonction chondro-osseuse chez les souris cKO. Ces résultats suggèrent ainsi que la réduction du nombre de trabécules est due au défaut d'hypertrophie chondrocytaire, une accélération de la différenciation des chondrocytes en phase terminale d'hypertrophie. Concernant l'os cortical dont l'épaisseur est augmentée, nous pouvons suggérer

une surexpression d'Ihh qui favorise la formation de l'os cortical via la stimulation de la différenciation des ostéoblastes.

Anomalies de la plaque de croissance et défaut de synthèse des PGs matriciels chez les souris déficientes en XT-I

L'ossification endochondrale s'accompagne de plusieurs modifications et changements de la morphologie cellulaire et des constituants de la MEC synthétisés par les chondrocytes. La MEC est composée d'eau, de collagène, de protéines non collagéniques, de glycoprotéines et de PGs. Grâce à ses constituants, la MEC joue un rôle crucial dans le maintien de la morphologie du cartilage, dans la prolifération cellulaire, la différenciation et l'organisation des chondrocytes. En ce qui concerne les PGs, de nombreux articles ont reporté leur implication dans la structure et la régulation de l'homéostasie du cartilage. C'est ainsi qu'il a été montré que les défauts fonctionnels du SLC26A2 (sulfate/chlorure antiporteur) peuvent entraîner une réduction du pool de sulfate intracellulaire, conduisant à la synthèse et à la sécrétion de PGs sous-sulfatés. Ceci entraîne une altération de l'architecture et des propriétés mécaniques de la MEC (Rossi et al., 1998 ; Kvist et al., 2006). En outre, des souris déficientes en chondroïtine sulfate N-acétylgalactosaminyltransférase (CSGalNAcT-1) montrent un nanisme important et présentent une plaque de croissance désorganisée et une réduction de la MEC principalement dans la zone proliférative (Sato et al., 2011). En 2014, des études menées par Lauing et al. sur un modèle de souris déficientes en agrécane au niveau du cartilage ont permis de montrer que ce PG régule la survie des chondrocytes, la transition morphologique, l'organisation cellulaire sous forme de colonnes et l'expression des gènes au niveau de la plaque de croissance (Lauing et al., 2014). Ajouté à cela, des études réalisées sur des modèles d'arthrose chez le rat, et l'homme, ont démontré que la XT-I est un facteur nécessaire pour maintenir l'homéostasie du cartilage (Venkatesan et al., 2009 ; Venkatesan et al., 2012). Vue l'importance des PGs et de la XT-I dans l'architecture et le maintien de l'homéostasie du cartilage, notre étude a pu confirmer ce rôle notamment au niveau de la plaque de croissance. En effet, nous avons analysé la structure de la plaque de croissance et du cartilage articulaire des souris âgées de 10 jours, 4 et 8 semaines. Le cartilage articulaire n'a pas montré de différence morphologique ni de signes d'arthrose entre les souris sauvages et les souris mutées. Une hypothèse pourrait être émise, c'est que l'âge étudié est beaucoup plus précoce que l'âge du développement de l'arthrose. Contrairement au cartilage articulaire, la plaque de croissance présente des anomalies importantes. À différents âges, cette dernière montre un faible contenu en GAGs et une zone hypertrophique moins importante chez les souris cKO. Les différentes zones sont difficiles à délimiter.

De plus, les cellules de la zone proliférative sont entassées les unes à côté des autres, avec une forme ronde et une MEC très réduite en particulier la MEC péricellulaire. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que ces cellules essaient de se rapprocher pour établir plus de contact entre elles ou par l'absence de MEC organisée. En ce qui concerne la zone préhypertrophique, elle est presque absente chez les souris mutées. La réduction des zones préhypertrophique et hypertrophique pourrait être due à une accélération de la différenciation en phase terminale d'hypertrophie et de l'ossification endochondrale chez les souris cKO, sans avoir des effets remarquables sur le passage de la phase proliférative vers l'hypertrophie. De ce fait, l'épaisseur de la zone proliférative n'a pas montré de différence, contrairement à celle des deux zones préhypertrophique et hypertrophique qui ont montré une réduction de leur épaisseur. La plaque de croissance est moins importante chez les souris âgées de 10 jours, ce qui suggère un effet biomécanique qui amplifierait cette désorganisation lors du déplacement des souris. Nous observons chez les souris cKO une réduction de l'épaisseur de la plaque de croissance par rapport aux souris WT à l'âge de 10 jours et de 4 semaines, mais à l'âge de 8 semaines, cette épaisseur est plus importante chez les souris cKO. Cette observation montre une ossification endochondrale plus avancée chez ces souris au début de leur croissance, mais qui se ralentit à partir de l'âge de 8 semaines. Ce qui est frappant dans ces trois cas, c'est que la zone hypertrophique des souris WT et cKO a toujours un contenu en PGs assez importante. Cette observation nous a mené à suggérer l'implication de l'isoforme XT-II dans la production des PGs au niveau de cette zone.

La déficience en XT-I est associée au défaut de fibrillation des fibres de Collagène de type II

Le collagène de type II forme un réseau qui est impliqué dans le support de la matrice des chondrocytes en interagissant avec les PGs. Il a été montré que la perte de collagène de type II a un effet drastique sur le développement du squelette et que les mutations génétiques du Col II sont associées à plusieurs maladies telles que la dysplasie squelettique et l'arthrose précoce (Kannu et al., 2010 ; Rukavina et al., 2014). Les études menées sur des souris déficientes en collagène II, montrent une chondrodysplasie létale caractérisée par une morphologie anormale des os qui résultent d'une absence complète d'ossification endochondrale et de formation des disques intervertébraux (Li et al., 1995 ; Aszódi et al., 1998). De plus, il a été reporté l'importance de la fibrillation des réseaux de collagène sur l'organisation en colonne des chondrocytes (Li et al., 1995). Au cours de notre travail de thèse nous avons analysé le contenu en collagène de la plaque de croissance par histologie après coloration au rouge Sirius. Nous avons observé une distribution non homogène chez les souris cKO âgées de 8 semaines. Ensuite, nous avons étudié l'organisation et

l'épaisseur des fibres par SHG et nous avons montré une épaisseur plus importante et une désorganisation de ces fibres au niveau des zones de repos et prolifératives chez les souris mutées. Etant donné que les interactions entre le collagène et les PGs sont nécessaire à la formation d'une matrice organisée et que la fibrillation du collagène est régulée par les PGs, en particulier l'agrécan et la décorine, nous pouvons suggérer un défaut de fibrillation du réseau de collagènes chez les souris cKO dû à une perturbation de la synthèse des chaînes de GAGs. Ceci pourrait également expliquer la désorganisation des chondrocytes au niveau de la plaque de croissance des souris cKO.

Anomalies de l'ossification primaire et secondaire chez les souris déficientes en XT-I

Les processus de chondrogenèse et d'ostéogenèse au cours de l'ossification endochondrale sont interdépendants. Malgré cette évidence, un nombre limité d'études a été consacré à des anomalies osseuses issues de mutations au niveau des chondrocytes. En effet, un modèle de souris postnatales déficient en *Ihh*, a montré une perte de l'organisation en colonne des chondrocytes et de nombreuses anomalies de la plaque de croissance et du cartilage articulaire. D'une façon plus importante, ces souris ont manifesté une perte continue des trabécules accompagnée d'une diminution de la signalisation de Wnts dans les ostéoblastes (Maeda et al., 2007). Un autre modèle de souris déficient conditionnel en *FGFR3*, a permis de montrer l'implication de ce facteur de croissance dans la régulation de la formation et du remodelage osseux par un mécanisme paracrine (Wen et al., 2016). De plus, Heinonen et al., 2017 ont étudié le rôle de *Snorc* (Small Novel Rich in Cartilage), un PG transmembranaire spécifique du cartilage, dans la chondrogenèse et le phénomène d'ossification. Ces études ont révélé un défaut de la maturation des chondrocytes et de l'ossification secondaire qui était moins développée chez les souris déficientes en *Snorc* (Heinonen et al., 2017). *Snorc* est un nouveau DS/CSPG transmembranaire. Il est exprimé au niveau du cartilage articulaire et de la plaque de croissance, spécifiquement au niveau des zones de repos, de prolifération et préhypertrophiques (Heinonen et al., 2011). En ce qui concerne la déficience en *XT-I*, l'examen de la structure du tissu cartilagineux de la plaque de croissance a révélé des anomalies de morphologie, de l'épaisseur, du contenu en GAGs et de maturation des chondrocytes. En outre, l'étude des structures osseuses par μ CT a montré des altérations de plusieurs paramètres histomorphométriques chez les souris cKO reflétant une perturbation de l'ossification périostée et endochondrale. Les anomalies de l'ossification primaire sont caractérisées par une augmentation de l'épaisseur des trabécules, une réduction de leur nombre et une augmentation de l'épaisseur de l'os cortical chez les souris cKO âgées de 8 semaines. En parallèle, nous avons observé un centre d'ossification secondaire réduit chez les souris

mutantes âgées de 10 jours par rapport aux souris sauvages. Cette réduction du centre d'ossification secondaire peut être attribuer à une augmentation de la zone hypertrophique qui entoure ce centre d'ossification. Ce retard d'ossification doit être confirmé par étude histologique de ce centre à différents âges (6, 7 et 8 jours) de la vie postnatale ainsi que l'analyse des marqueurs et des facteurs impliqués dans la vascularisation et la formation du centre d'ossification secondaire tels que VEGF, Col X et MMP13.

Surexpression des marqueurs chondrocytaires due à l'invalidation du gène *XylTI*

Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de ces perturbations de la chondrogenèse et d'ossification, des analyses de l'expression des marqueurs matriciels spécifiques des chondrocytes et des ostéoblastes ont été réalisées par hybridation *In Situ* chez les souris sauvages et mutées. Dans un premier temps, nous avons analysé l'expression de l'agrécan et du collagène II, marqueurs du phénotype chondrocytaire. L'expression de l'agrécan est augmentée chez les souris cKO, suggérant une compensation de la perte des chaînes de GAGs par l'augmentation de la synthèse de la protéine core. Ce phénomène de compensation est observé dans les stades tardifs d'arthrose durant lesquels une augmentation de la synthèse protéique du biglycan et de la décorine est détectée au niveau du cartilage articulaire (Bock et al., 2001). L'expression du collagène de type II, marqueur spécifique des chondrocytes au repos et en prolifération, est également augmentée chez les souris cKO. Cette augmentation pourrait être due à un phénomène de compensation causé par la perturbation de la fibrillogenèse du collagène II au niveau de la plaque de croissance chez les souris cKO. En parallèle, l'analyse de l'expression du collagène X, marqueur de la maturation des chondrocytes, est plus importante dans un domaine réduit chez les souris cKO indiquant un défaut de maturation des chondrocytes.

La chondrogenèse est un processus réalisé en plusieurs étapes successives comprenant la différenciation, la prolifération et la maturation des chondrocytes. Toutes ces étapes sont sous le contrôle de facteurs systémiques (GH, T3, IGF-1), locaux solubles (TGF- β s, FGFs, Wnts, *Ihh*, PTHrP, IGF-1, BMPs) et des composants de la MEC qui aboutissent à la formation d'un cartilage organisé et structuré facilitant ainsi la mise en place du processus d'ossification.

Perturbation de la voie de signalisation de TGF- β

La signalisation du TGF- β est impliquée dans un large éventail d'activités cellulaires à la fois dans des conditions physiologiques et pathologiques. Elle régule l'expression des gènes à travers plusieurs voies de signalisation. Parmi elles, la voie TGF- β -Smad qui est la voie canonique la mieux caractérisée. Elle agit

via ses récepteurs (TβRI, TβRII et TβRIII), qui possèdent des domaines glycosylés. Le TβRIII est un bétaglycane qui joue le rôle de corécepteur (López-Casillas et al., 1991). La liaison du TGF-β sur le récepteur TGF-β de type II (TβRII) induit la phosphorylation du récepteur de type I (TβRI), qui active ensuite les Smads (Li et al., 2009). Durant la chondrogenèse, la signalisation du TGF-β favorise la condensation et la différenciation des cellules mésenchymateuses en chondrocytes, et maintient les chondrocytes au repos dans un stade quiescent en favorisant la fixation du Sox9 sur les promoteurs de Col II et de l'agrécan stimulant ainsi l'expression de ces gènes (Cleary et al., 2015 ; Green et al., 2015). Elle favorise aussi l'expression de N-cadérine nécessaire dans l'adhésion des cellules (Tuli et al., 2003 ; Li and Xu 2005 ; van der Kraan et al., 2009). Le rôle du TGF-β durant l'étape terminale de la différenciation chondrocytaire est variable. C'est ainsi qu'il a été montré que la signalisation du TGF-β, via les Smad2/3 inhibe l'hypertrophie alors que sa signalisation via les Smads 1/5/8 favorise l'hypertrophie chondrocytaire en augmentant le taux du Runx2 ainsi que la stimulation de l'expression du collagène X et de la phosphatase alcaline, les marqueurs d'hypertrophie (Wu et al., 2008 ; Miyazono et al., 2004 ; van der Kraan et al., 2009). L'implication des TGF-βs dans la chondrogenèse et le processus d'ossification endochondrale a été étudiée sur des modèles de souris *knockout*. C'est ainsi que des études ont montré que la déficience en TGF-β2 entraîne une chondrodysplasie chez les souris et que la déficience en TGF-β1 entraîne une croissance osseuse réduite et un défaut de minéralisation (Chen et al., 2012 ; Le Goff and Cormier-Daire, 2015). En ce qui concerne les récepteurs, leur rôle dans le maintien de la plaque de croissance a été montré. C'est ainsi que la déficience en TβRII, révèle l'importance de la signalisation du TGF-β dans la formation d'une plaque de croissance normale (Jin et al., 2011). Cependant, l'étude des souris transgéniques surexprimant une forme tronquée du TβRII dominante-négative dans la plaque de croissance épiphysaire montre une surexpression de certains marqueurs de maturation chondrocytaire tels que Col10 et Ihh (Huang et al., 2004). L'expression des récepteurs TβRI et TβRII est observée dans les zones de repos, de prolifération et de maturation de la plaque de croissance épiphysaire chez le rat (Matsunaga et al., 1999). En outre, des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse exposées au TGF-β expriment des marqueurs chondrogéniques (collagène de type II et agrécane), induisant leur différenciation en chondrocytes (Tamamura et al., 2005). La BMP-2, un membre appartenant à la grande famille du TGF-β, est impliquée dans la prolifération et la maturation des chondrocytes durant la chondrogenèse et l'ossification endochondrale en agissant sur l'expression de Runx2 (Zhou et al., 2016). Nous avons analysé l'expression des deux récepteurs du TGF-β, TβRII et TβRIII, par immunohistochimie chez les souris âgées de 10 jours. L'examen histologique révèle une surexpression de ces deux récepteurs

dans la plaque de croissance des souris cKO particulièrement au niveau de la zone de repos, de la zone proliférative et de la surface articulaire, alors que cette expression est plus localisée au niveau de la zone hypertrophique et articulaire chez les souris sauvages. La surexpression des récepteurs T β RII et T β RIII ainsi que la surexpression du collagène X, de l'agrécan et du collagène II détectée suggère l'activation de la voie de signalisation du TGF- β chez les souris mutées. Il a été montré que les PGs (SLRPs) séquestrent le TGF- β dans la MEC ce qui inhibe son activité (Nikitovic et al., 2012). Dans le cas des souris déficientes en XT-I, l'activation de la voie du TGF- β pourrait être due à la surexpression des récepteurs et à la disponibilité du TGF- β sous forme libre du fait de la déficience en GAGs des PGs. Dans le but de déterminer l'impact de l'activation de la voie TGF- β sur le nanisme des souris cKO, nous avons injecté les souris cKO avec un inhibiteur du T β RI (ALK). Le suivi hebdomadaire des différents groupes de souris a montré une récupération d'environ 5.9% de la taille chez les souris traitées par le tamoxifène en association avec l'inhibiteur de T β RI par rapport aux souris traitées uniquement par le tamoxifène. Ce résultat suggère l'implication du TGF- β dans le nanisme observé chez les souris mutées. L'analyse des marqueurs chondrogéniques et ostéogéniques sur des coupes histologiques de genou de souris devait permettre de déterminer si l'inhibition du TGF- β améliore la structure de la plaque de croissance et du tissu osseux.

Dérégulation de la voie de signalisation de Wnt

Comme le TGF- β , la voie de signalisation de Wnt est impliquée dans le processus de chondrogenèse et d'ossification endochondrale. WNTs constitue une famille de glycoprotéines secrétées, impliquée dans le développement, la croissance et l'homéostasie de différents tissus et organes parmi lesquels l'os et le cartilage. En effet, des études menées sur Wnt4 ont montré son implication dans la formation du cartilage articulaire et de la plaque de croissance. C'est ainsi que Wnt4 bloque l'initiation de la chondrogenèse mais accélère la différenciation terminale des chondrocytes *in vitro* (Hartmann and Tabin, 2000). Il a été montré que la surexpression de Wnt4 induit des défauts de maturation chondrocytaire, la diminution de l'expression du VEGF, la désorganisation de la plaque de croissance et conduit au nanisme (Lee and Behringer, 2007). Wnt5b à son tour agit sur la chondrogenèse. Contrairement à Wnt4, Wnt5b favorise la transition des chondrocytes de repos vers les chondrocytes prolifératifs et inhibe la différenciation terminale des chondrocytes *in vivo* (Hartmann and Tabin, 2000 ; Yang et al., 2003). En ce qui concerne la localisation et le lieu d'expression de ces molécules, il a été démontré que Wnt4 est exprimé au niveau du cartilage articulaire, des cellules hypertrophiques de la plaque de croissance et les cellules

mésenchymateuses, alors que Wnt5b est exprimé au niveau des zones préhypertrophique et hypertrophique de la plaque de croissance (Church, 2002 ; Andrade et al., 2007). La signalisation de Wnts est transmise par des récepteurs transmembranaires (FZD) en combinaison avec des corécepteurs (LRP5/6). Leur spécificité est déterminée par plusieurs paramètres parmi lesquels la présence de cofacteurs comme les PGs à héparane sulfate situés au niveau de la membrane plasmique tels que le syndécan et le glypican (Kikuchi et al., 2009 ; Xie et al., 2018). Il a été montré que l'activité des Wnts dépend du stade de développement. En effet, durant la chondrogenèse, la voie canonique Wnt/ β -caténine agit sur deux stades, le stade précoce durant lequel elle agit à un faible taux afin de favoriser la différenciation des progéniteurs, et à un stade avancé durant lequel elle agit à un taux élevé afin de favoriser la différenciation des chondrocytes en cellule hypertrophique et l'ossification endochondrale (Ma et al., 2013). De plus, il a été montré que des mutations au niveau de la voie β -caténine entraîne une désorganisation de la plaque de croissance, l'absence de maturation chondrocytaire et d'ossification endochondrale, qui résultent probablement d'un dépôt anormale de la MEC (Tamamura et al., 2005). L'activation de cette voie favorise l'ossification et la maturation en stimulant l'hypertrophie et la minéralisation via l'expression de MMP13 et VEGF. A côté de la voie β -caténine, deux autres voies de signalisation existent ; la voie du calcium (Wnt/calcium) et la voie non canonique (PCP : planar cell polarity) impliquée dans la polarité et l'arrangement des cellules au cours de la croissance longitudinale des éléments squelettiques. Comme on le savait, la plaque de croissance mature est constituée de différentes zones ; la zone de repos, la zone proliférative et la zone hypertrophique, qui varient en termes d'arrangement des chondrocytes, de fonction et de composition de la matrice (Radhakrishnan et al., 2004). La zone proliférative est caractérisée par une division cellulaire rapide suivie de l'aplatissement et de l'arrangement des chondrocytes en colonne de 6 à 8 cellules aplaties entourées de différents compartiments matriciels riches en collagène, en protéoglycanes et d'autres composantes. La tension des fibrilles de collagène matricielles et la pression osmotique de l'aggrécane hautement chargé sont responsables des propriétés mécaniques spécifiques du cartilage en particulier la résistance aux contraintes de traction, de compression et de cisaillement. Cette disposition en colonne essentielle à l'élongation osseuse est favorisée par la division des chondrocytes selon l'axe longitudinal de l'os long résultant en deux cellules-filles qui s'aplatissent progressivement et glissent les unes sur les autres par des mouvements de rotation (Dodds, 1930). Le mécanisme qui guide les chondrocytes en rotation autour de la structure en colonnes lors de la division cellulaire reste encore incertaine. Mais, des études montrent que le destin des cellules et, par conséquent, la morphologie et la fonction des tissus sont étroitement contrôlés par les

propriétés mécaniques de leur micro-environnement (Lee-Thedieck et al, 2012 ; Discher et al, 2009). C'est ainsi qu'il a été montré que l'intégrine $\beta 1$ est impliquée dans la motilité et la prolifération des chondrocytes et que sa déficience entraîne une perte de l'organisation colonnaire des chondrocytes et un changement de leur morphologie dû au manque d'adhésion cellulaire à la MEC, surtout le collagène de type II (Aszodi et al., 2003). Une autre étude a montré une corrélation étroite entre la structure et la rigidité de la MEC et l'organisation des chondrocytes de la zone proliférative de la plaque de croissance en développement. Les résultats de cette étude suggèrent que la rigidité plus élevée de l'ECM dans la matrice interterritoriale par rapport à la matrice territoriale et péricellulaire, peut forcer la disposition en colonne des cellules et ainsi conduire à un allongement des os (Prein et al., 2016). De plus, il a été montré que la polarité cellulaire planaire (PCP) régule l'organisation en colonne des chondrocytes au niveau de la plaque de croissance par la voie de signalisation non canonique de Wnt (Li and Dudley, 2009). En effet, cette étude montre que l'inhibition de Fzd7 induit le raccourcissement et l'élargissement des éléments squelettiques chez les poussins. De plus, Gao et al., 2011 ont montré que ROR2 (Receptor Tyrosine Kinase Like Orphan Receptor 2) et Vangl2 (Van Gogh-Like 2) forment un complexe de récepteurs induit par Wnt et sont essentiels au processus de PCP et à l'organisation de la plaque de croissance. Le rôle de Wnt5b dans la polarité des chondrocytes a été montré par Randall et al. en 2012. Les résultats de cette étude montrent que le traitement des chondrocytes déficients en Fzd7 avec Wnt5b favorise l'aplatissement cellulaire, ressemblant à la morphologie des chondrocytes au niveau de la zone de prolifération. Vue l'importance de la voie de Wnt durant l'ossification endochondrale, nous avons étudié l'expression de deux membres de cette famille, Wnt4 et Wnt5b. Les résultats montrent une surexpression de ces deux ligands (Wnt4 et Wnt5b) dans la plaque de croissance de souris cKO âgées de 10 jours surtout au niveau des zones proliférative et de la surface articulaire, alors que cette expression est plus localisée au niveau de la zone hypertrophique et articulaire chez les souris WT. Cette localisation perturbée de ces deux médiateurs chez les souris cKO, pourrait induire un dysfonctionnement des chondrocytes prolifératifs dans la plaque de croissance. De plus, le taux élevé de ces deux ligands pourrait aboutir à une activation de la voie canonique qui à son tour pourrait favoriser la maturation et l'accélération de l'ossification endochondrale chez les souris déficientes en XT-I. En outre, cette dérégulation pourrait expliquer aussi la désorganisation de la plaque chez les souris cKO. Cette structure organisée de la plaque de croissance est étroitement liée aux actions de Wnt sur l'adhésion cellulaire (Cadigan and Nusse, 1997). La surexpression de Wnt4 pourrait modifier la composition de la MEC ou l'expression des molécules d'adhésion qui va s'accroître aux stades avancés de la croissance des souris cKO déficientes en XT-I. De même, la surexpression de Wnt5b

chez les souris cKO n'a pas pu rétablir l'organisation en colonne des chondrocytes, ce qui pourrait indiquer que la voie de signalisation non canonique PCP induite par Wnt5b est perturbée à cause des défauts au niveau de la MEC et/ou à l'activation de la voie canonique par Wnt4.

Manque d'effet sur le taux sérique d'IGF-1 circulant chez les souris déficientes en XT-I

Outre les voies de signalisation du TGF- β et de Wnt, nous avons analysé la voie de l'IGF-1 (Insulin-like-growth factor-I). Ce dernier est un facteur soit systémique sécrété principalement par le foie, soit sécrété par les chondrocytes et les ostéoblastes en agissant de façon paracrine et autocrine. Dans les deux cas, ce facteur est important dans le développement squelettique, la chondrogenèse et l'ossification (Tahimic et al., 2013). La production de sa forme circulatoire est dépendante de l'hormone de croissance (GH). Celle-ci peut avoir soit des effets directs sur l'ossification endochondrale postnatale soit indirects dépendants de l'IGF-1 circulant. De plus, cette hormone est capable de stimuler la production d'IGF-1 locale au niveau des tissus cartilagineux et osseux. Durant le développement embryonnaire et postnatal précoce, l'IGF-1 locale est synthétisé indépendamment de cette hormone. L'IGF-1 semble avoir un rôle important dans le maintien de la prolifération des chondrocytes. Il a été montré que la déficience en IGF-1 chez un modèle de souris *knockout* induit une infertilité, un retard de la croissance chez les nouveau-nés et des défauts cartilagineux et osseux (Wang et al., 2006). Des souris déficientes en IGF-1 au niveau du cartilage présentent un nanisme mais sans avoir de changement du taux sérique (Govoni et al., 2007). Des souris déficientes en IGF-1R (récepteur de l'IGF-1 et en partie pour IGF-2) au niveau des chondrocytes, présentent une létalité postnatale et un nanisme sans changement du taux sérique de l'IGF-1 (Wu et al., 2015). Notre analyse du taux sérique de l'IGF-1 ne montre pas de différence significative entre les souris cKO et les souris WT. Il serait plus intéressant d'étudier l'expression de l'IGF-1 chondrocytaire et de son récepteur.

Perturbation de l'activité des ostéoblastes chez les souris déficientes en XT-I

La déficience en XT-I produit des effets remarquables sur la chondrogenèse et la maturation des chondrocytes, ainsi que sur le processus d'ossification. Notre étude histologique des os longs et des cellules qui les constituent montrent une activité importante des ostéoblastes et des ostéoclastes ainsi qu'un épaissement des os trabéculaires et corticaux, suggérant un dépôt matriciel accru. Nous avons analysé l'expression du collagène de type I au niveau des ostéoblastes dérivés des os longs des souris mutées et sauvages. Ces cellules jouent un rôle actif dans la synthèse du collagène de type I et dans la calcification de la matrice osseuse. Le collagène de type I comme les autres collagènes fibrillaires sont

synthétisés sous forme de précurseurs, les procollagènes qui sont clivés rapidement par des protéases spécifiques, ADAMTS 2 et BMP1, afin que des molécules plus courtes s'assemblent pour former des fibrilles (Canty and Kadler, 2005). Les fibres collagéniques ainsi formées sont associées à des protéines non collagéniques secrétées par les ostéoblastes telles que les composants de la famille SIBLING (Small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein) et à des protéines plasmatiques et des facteurs de croissance. Cette matrice nouvellement formée, appelée tissu ostéoïde sera minéralisée dans un second temps pour former la matrice inorganique. L'orientation et l'épaisseur des lamelles de collagène ainsi que des composants inorganiques fournissent l'architecture spécifique de l'os cortical. Cette architecture lamellaire assure la stabilité biomécanique et la résistance à la traction d'un os compact (Forlino and Marini, 2016). En effet, il a été montré que dans l'arthrite chronique, l'expression et le remodelage du collagène de type I sont altérés, ce qui entraîne une fragilité accrue des os (Caetano-Lopes et al., 2010). Chez les souris déficientes en XT-I, nous avons montré une expression élevée du collagène de type I. Il sera important d'étudier l'expression, l'organisation et la structure de ces fibres au niveau des tissus osseux des souris mutées et sauvages et d'examiner la prédisposition aux fractures.

Les protéines non collagéniques constituent 10% du tissu organique de l'os et 2% du poids total de l'os. On peut les classer en plusieurs groupes parmi lesquelles la famille de SIBLING qui est exprimée dans les os et/ou les dents (Fisher et al., 2001). Cependant, cette expression ne se limite pas aux tissus minéralisés mais s'étend à une variété de cellules, de tissus et de fluides corporels (Sodek et al., 2000). Cette famille comprend plusieurs protéines parmi lesquelles l'OPN, la DMP, la MEPE et la BSP. L'OPN a de nombreuses fonctions biologiques. En effet, elle est un régulateur important du remodelage osseux et de la cristallinité minérale et elle est associée à des événements pathologiques tels que l'infection, l'inflammation, la cicatrisation, la métastase du cancer et la calcification des tissus (Denhardt et al., 2001). Il est important de noter que le rôle régulateur de l'OPN dans la minéralisation normale et pathologique dépend fortement de l'état de phosphorylation de la protéine. Ainsi, la déphosphorylation de l'OPN entrave sa capacité à inhiber la formation de l'hydroxyapatite (Boskey et al., 1993) et la phosphorylation intervient dans la stimulation de la résorption osseuse (Saad et al., 2008). De plus sa déficience chez un modèle de souris *knockout* montre une augmentation du contenu minéral et des cristaux d'hydroxyapatite ainsi qu'une altération de la fonction des ostéoclastes (Boskey et al., 2002 ; Franzén et al., 2007). En outre, la DMP1 et la MEPE sont connus pour leur rôle inhibiteur de la biominéralisation au niveau des tissus osseux (Staines et al., 2012). En effet, il a été montré que la déficience en MEPE aboutit à une augmentation de la densité osseuse et de l'épaisseur de l'os trabéculaire (Lu et al., 2004). L'étude de ces trois protéines

(OPN, DMP1 et MEPE) montre une surexpression de l'OPN, contrairement aux DMP1 et MEPE dont l'expression est diminuée, indiquant une activité accrue des ostéoblastes et une possible augmentation de la biominéralisation. Ces résultats nécessitent d'être confirmés par plusieurs approches telles que l'analyse de la minéralisation par la coloration Van Kossa sur des coupes histologiques non décalcifiées, l'analyse du processus de minéralisation *in vitro*, l'analyse de l'état de phosphorylation de l'OPN, l'analyse de l'expression de la phosphatase alcaline, impliquée dans le processus de minéralisation, dans la phosphorylation de l'OPN et dans la maturation et la production de la matrice ostéogénique (Anderson, 2003 ; Addison et al., 2007).

La régulation de la formation osseuse est entamée par les facteurs de transcription *Runx2* et *Osx*. *Runx2* est un facteur important dans la stimulation de l'hypertrophie et dans le contrôle de la prolifération chondrocytaire en régulant le niveau d'expression d'*Ihh*, et son expression est régulée par le PTHrP durant l'ossification endochondrale (Chen et al., 2014). De plus, des souris invalidées pour le gène *Runx2* au niveau des chondrocytes montrent une perte complète de l'ossification endochondrale (Chen et al., 2014). En ce qui concerne l'ossification intramembranaire, il a été montré que la déficience de *Runx2* conduit à une dysplasie cléidocranienne en raison d'un défaut de différenciation des ostéoblastes (Otto et al., 1997 ; Takarada et al., 2016). *Runx2* favorise l'expression d'*osterix* (*Osx*) qui à son tour régule la synthèse des constituants de la MEC et sa minéralisation. Des souris *knockout* pour *Osx*, montrent un manque complet de la formation osseuse (Nakashima et al. 2002). Nous avons analysé l'expression d'*Osx* au niveau des ostéoblastes et nous avons montré une surexpression chez les souris déficientes en XT-I. Vue cette augmentation nous pouvons suggérer une synthèse importante des composants de la matrice osseuse principalement le collagène de type I et l'OPN ainsi qu'une activité accrue des ostéoblastes chez les souris mutées.

Le processus de différenciation et de maturation des ostéoblastes comme beaucoup d'autres mécanismes, est régulé par plusieurs facteurs de croissance et des cytokines. Etant donné que nous avons montré des anomalies au niveau des ostéoblastes, il était important d'étudier certaines voies de signalisation qui pourraient être la cause de ces anomalies et plus particulièrement la voie canonique de Wnt. L'analyse de l'expression de la β -caténine et de pERK (voie non canonique) a montré une élévation de leur expression chez les ostéoblastes des souris mutées. Ces résultats suggèrent une dérégulation de la voie de Wnt reflétée par une augmentation de l'expression de la β -caténine.

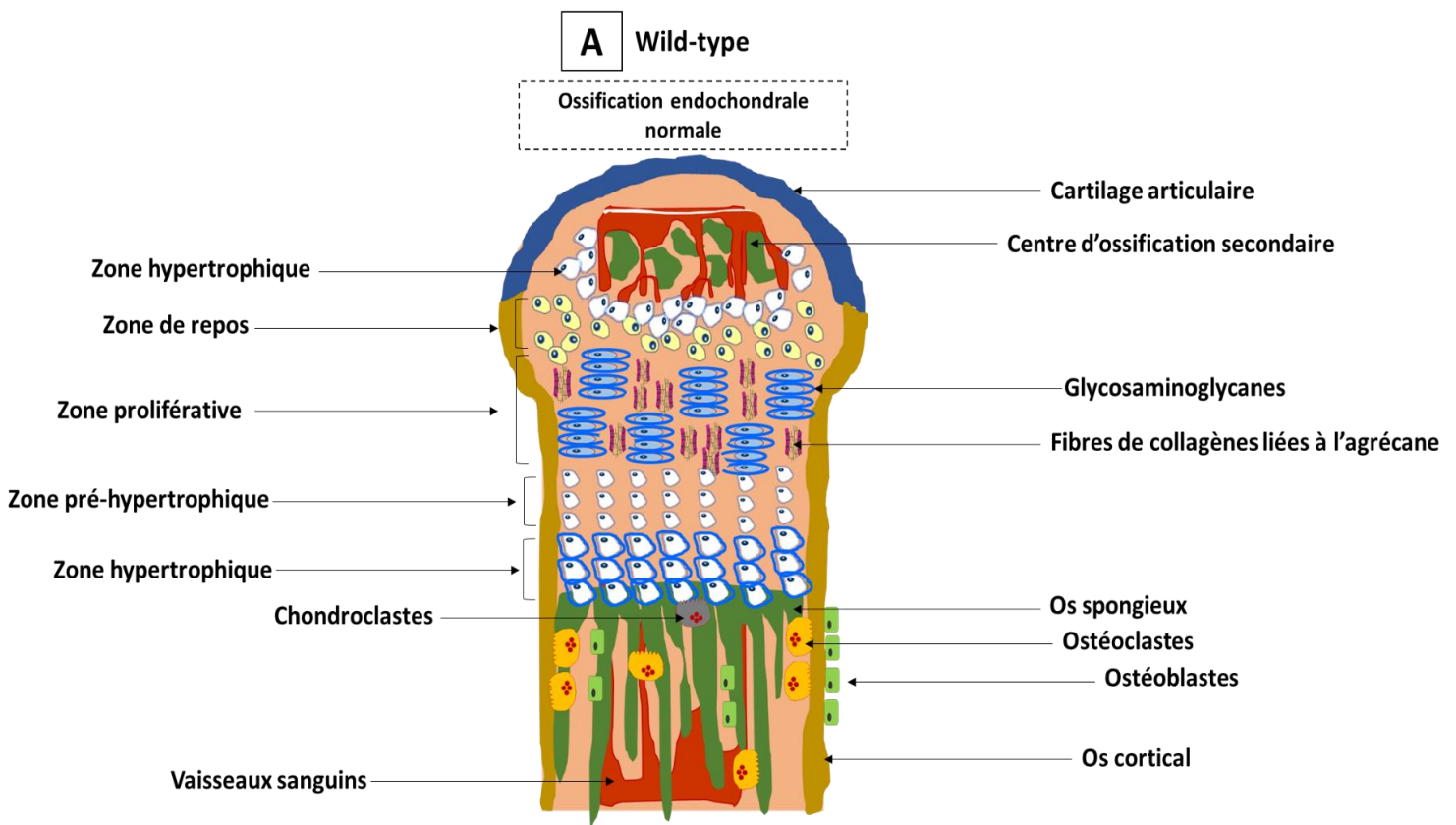
***CONCLUSION ET
PERSPECTIVES***

Conclusion et perspectives

Ce travail de recherche nous a permis de montrer le rôle crucial de la XT-I durant le développement ostéoarticulaire. La déficience en XT-I provoque un défaut de synthèse des PGs matriciels qui jouent un rôle important dans la structure de la MEC, dans la disponibilité des facteurs de croissance et dans la fibrillation du collagène de type 2, un des composants majeurs de la matrice cartilagineuse. Cet ainsi que la déficience en GAGs induit un défaut de fibrillation des fibres de collagènes, une désorganisation de la MEC ainsi que la perte de l'organisation en colonne des chondrocytes de la zone proliférative. Nous avons montré que les chondrocytes de cette zone ont une morphologie plus arrondie que celle des souris sauvages et une perte probable de leur polarité due à une perturbation de la voie de signalisation de Wnts impliquée dans ce phénomène. De plus, nous avons montré une perturbation au niveau de la voie de signalisation de TGF- β mise en relief par une surexpression de ses récepteurs TGF β R2 et TGF β R3. Cette surexpression favorise l'augmentation de l'expression de collagène II afin de compenser le défaut de fibrillation, de l'agrécane dans le but de compenser le défaut de glycosylation, du collgène X, de l'Ihh, de MMP13. La surexpression de MMP13 favorise la dégradation de la matrice cartilagineuse dans le but d'être remplacée par du tissus osseux. En outre, la surexpression d'Ihh induit la différenciation des ostéoblastes de l'os cortical et ceux d'origine sanguine afin de former l'os spongieux et cortical. En effet, nous avons détecté une surexpression de l'ostéopontine et de l'ostéocalcine, marqueurs de la phase terminale de la différenciation hypertrophique et de l'activité ostéoblastique. Cette activité ostéoblastique importante stimule les ostéoclastes afin de digérer la matrice, ce qui aboutit à une accélération de la phase terminale d'hypertrophie, une accélération de l'ossification endochondrale et un remodelage osseux important (Figure 59). De plus, ce travail a permis de révéler une ossification de la trachée et des anomalies de minéralisation et de différenciation des ostéoblastes chez les souris déficientes en XT-I. Finalement, nous avons pu montrer que l'inhibition de la voie de TGF- β pourrait être une voie de traitement du nanisme observé chez les souris déficientes en XT-I.

Par la suite, il serait intéressant de déterminer les facteurs et les mécanismes responsables de la perturbation des voies de signalisation TGF- β et Wnt. Il est également important de déterminer le lien entre l'altération de la synthèse des PGs et les anomalies de développement observées en particulier mettre en évidence les PGs impliqués. Il a été montré que la XT-I joue un rôle important dans la régulation de la synthèse des PGs au niveau du cartilage au cours de processus pathologiques telsque l'arthrose, il est donc important d'évaluer la prédisposition des souris *Col2a1-CreERTM;XylT1^{fllox/fllox}* au développement de

l'arthrose. D'autre part, il serait important d'étudier le rôle de la XT-I dans l'ostéogenèse par invalidation spécifique au niveau des ostéoblastes en utilisant des souris *Coll-Cre* ou *Osx-Cre*. Enfin, il faudrait poursuivre les traitements des souris invalidées pour la XT-I par des inhibiteurs ou des anticorps spécifiques ciblant la voie du TGF- β et de Wnt afin d'identifier des molécules et des traitements capables de traiter le nanisme et les anomalies squelettiques ce qui pourrait déboucher sur un traitement chez l'homme.



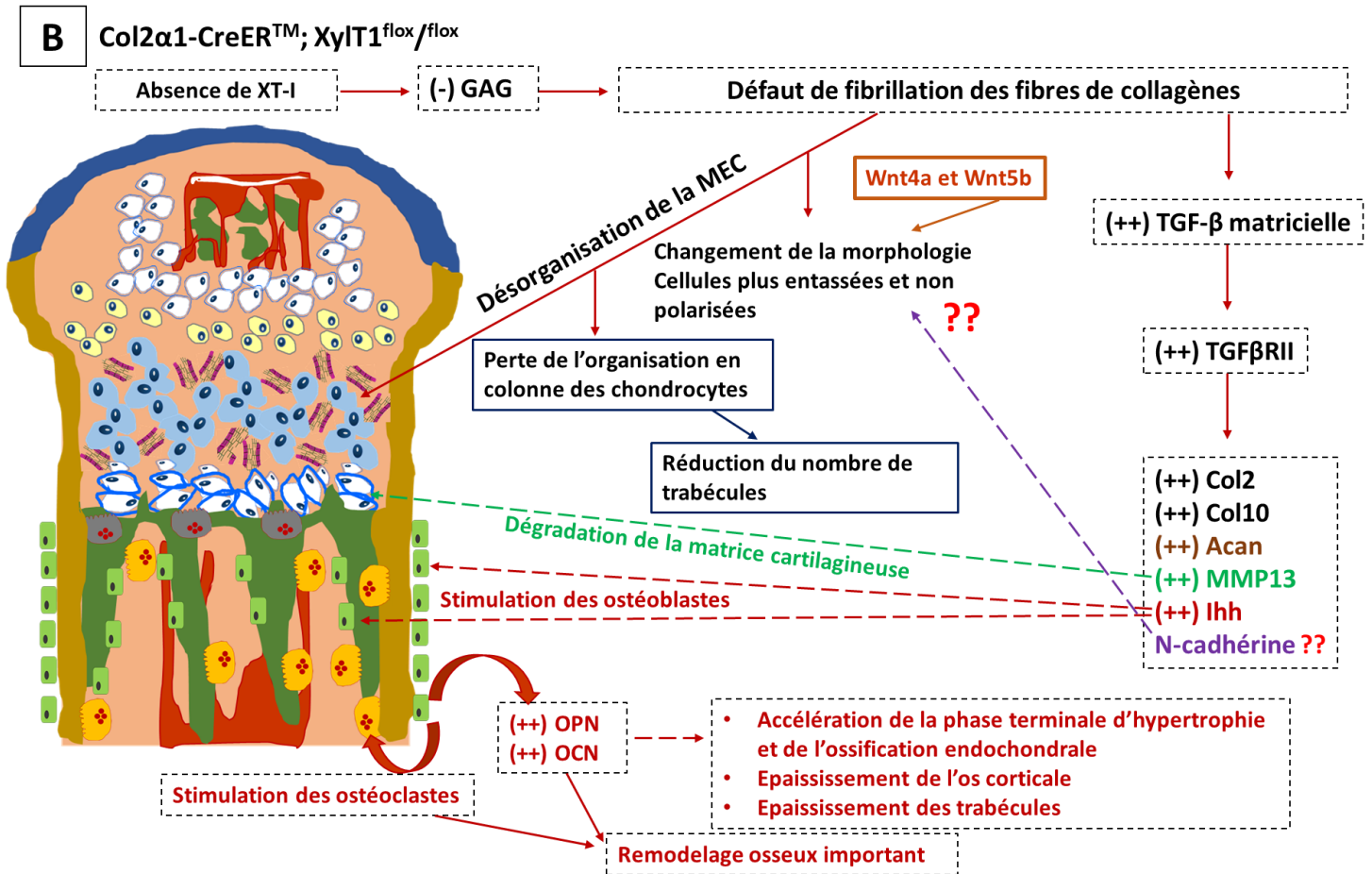


Figure 59 : Schéma récapitulatif de l'effet de la déficience en XT-I sur la chondrogenèse, le processus d'ossification endochondrale et le remodelage osseux. *A-* Le processus d'ossification endochondrale normale chez les souris sauvages (WT : Wild-type). *B-* Les effets de l'inactivation de la XT-I chez les souris Col2 α 1-CreERTM; XylT1^{flox/flox}. + : Présence, - : Absence.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abad V, De Luca F, Uyeda AJ, Bacher DJ, Baron J, 1999. Spatial Orientation of Growth Plate Chondrocytes. *Pediatric Research* **45**, 83A.

Addison WN, Azari F, Sørensen ES, Kaartinen MT, McKee MD, 2007. Pyrophosphate Inhibits Mineralization of Osteoblast Cultures by Binding to Mineral, up-Regulating Osteopontin, and

- Inhibiting Alkaline Phosphatase Activity. *The Journal of Biological Chemistry* **282**, 15872-15883.
- Adhami MD, Rashid H, Chen H, Clarke JC, Yang Y, Javed A, 2015. Loss of Runx2 in Committed Osteoblasts Impairs Postnatal Skeletogenesis. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **30**, 71-82.
- Aghajanian P, and Subburaman M, 2018. The Art of Building Bone: Emerging Role of Chondrocyte-to-Osteoblast Transdifferentiation in Endochondral Ossification. *Bone Research* **6**, 1-19.
- Aguirre JI, Lilian IP, Stewart SA, Weinstein RS, Parfitt AM, Manolagas SC, Bellido T, 2006. Osteocyte Apoptosis Is Induced by Weightlessness in Mice and Precedes Osteoclast Recruitment and Bone Loss. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **21**, 605-615.
- Ahmed YA, Tatarczuch L, Pagel CN, Davies HM, Mirams M, Mackie EJ, 2007. Physiological Death of Hypertrophic Chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage* **15**, 575-586.
- Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrughe B, 2002. The Transcription Factor Sox9 Has Essential Roles in Successive Steps of the Chondrocyte Differentiation Pathway and Is Required for Expression of Sox5 and Sox6. *Genes & Development* **16**, 2813-2828.
- Alford AI, Kenneth KM, Hankenson KD, 2015. Extracellular Matrix Networks in Bone Remodeling. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **65**, 20-31.
- Al-Jezawi NK, Ali BR, Al-Gazali L, 2017. Endoplasmic Reticulum Retention of Xylosyltransferase 1 (XYLT1) Mutants Underlying Desbuquois Dysplasia Type II. *American Journal of Medical Genetics* **9999**, 1-9.
- Ameys L, Aria D, Jepsen K, Oldberg A, Xu T, Young MF, 2002. Abnormal Collagen Fibrils in Tendons of Biglycan/Fibromodulin-Deficient Mice Lead to Gait Impairment, Ectopic Ossification, and Osteoarthritis. *The FASEB Journal* **16**, 673-680.
- Ameys L, Young MF, 2002. Mice Deficient in Small Leucine-Rich Proteoglycans: Novel in Vivo Models for Osteoporosis, Osteoarthritis, Ehlers-Danlos Syndrome, Muscular Dystrophy, and Corneal Diseases. *Glycobiology* **12**, 107R-116R.
- Anderson HC, 2003. Matrix Vesicles and Calcification. *Current Rheumatology Reports* **5**, 222-226.
- Andersen TL, Sondergaard TE, Skorzynska KE, Dagnaes-Hansen F, Plesner TL, Hauge EM, Plesner T, Delaisse JM, 2009. A Physical Mechanism for Coupling Bone Resorption and Formation in Adult Human Bone. *The American Journal of Pathology* **174**, 239-247.
- Andrade AC, Nilsson O, Barnes KM, Baron J, 2007. Wnt Gene Expression in the Post-Natal Growth Plate: Regulation with Chondrocyte Differentiation. *Bone* **40**, 1361-1369.
- Arikawa-Hirasawa E, Watanabe H, Takami H, Hassell JR, Yamada Y, 1999. Perlecan Is Essential for Cartilage and Cephalic Development. *Nature Genetics* **23**, 354-358.

- Aszódi A, Chan D, Hunziker E, Bateman JF, Fässler R, 1998. Collagen II Is Essential for the Removal of the Notochord and the Formation of Intervertebral Discs. *The Journal of Cell Biology* **143**, 1399-1412.
- Aszodi A, Hunziker EB, Brakebusch C, Fässler R, 2003. Beta1 Integrins Regulate Chondrocyte Rotation, G1 Progression, and Cytokinesis. *Genes & Development* **17**, 2465-2479.
- Baldrige D, Shchelochkov O, Kelley B, Lee B, 2010. Signaling Pathways in Human Skeletal Dysplasias. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **11**, 189-217.
- Balemans W, Van Hul W, 2002. Extracellular Regulation of BMP Signaling in Vertebrates: A Cocktail of Modulators. *Developmental Biology* **250**, 231-250.
- Bassett JH, Swinhoe R, Chassande O, Samarut J, Williams GR, 2006. Thyroid Hormone Regulates Heparan Sulfate Proteoglycan Expression in the Growth Plate. *Endocrinology* **147**, 295-305.
- Beederman M, Lamplot JD, Nan G, Wang J, Liu X, Yin L, Li R, Shui W, Zhang H, Kim SH, Zhang W, Zhang J, Kong Y, Denduluri S, Rogers MR, Pratt A, Haydon RC, Luu HH, Angeles J, Shi LL, He TC, 2013. BMP Signaling in Mesenchymal Stem Cell Differentiation and Bone Formation. *Journal of Biomedical Science and Engineering* **6**, 32-52.
- Benjamin M, Archer CW, Ralphs JR, 1994. Cytoskeleton of Cartilage Cells. *Microscopy Research and Technique* **28**, 372-77.
- Emelie B, Sävendahl L, 2017. The Physiology of Childhood Growth: Hormonal Regulation. *Hormone Research in Paediatrics* **88**, 6-14.
- Bhosale AM, Richardson JB, 2008. Articular Cartilage: Structure, Injuries and Review of Management. *British Medical Bulletin* **87**, 77-95.
- Bi Y, Stuelten CH, Kilts T, Wadhwa S, Iozzo RV, Robey PG, Chen XD, Young MF, 2005. Extracellular Matrix Proteoglycans Control the Fate of Bone Marrow Stromal Cells. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 30481-30489.
- Bochukova E, Schoenmakers N, Agostini M, Schoenmakers E, Rajanayagam O, Keogh JM, Henning E, Reinemund J, Gevers E, Sarri M, Downes K, Offiah A, Albanese A, Halsall D, Schwabe JW, Bain M, Lindley K, Muntoni F, Vargha-Khadem F, Dattani M, Farooqi IS, Gurnell M, Chatterjee K, 2012. A Mutation in the Thyroid Hormone Receptor Alpha Gene. *The New England Journal of Medicine* **366**, 243-249.
- Bock HC, Michaeli P, Bode C, Schultz W, Kresse H, Herken R, Miosge N, 2001. The Small Proteoglycans Decorin and Biglycan in Human Articular Cartilage of Late-Stage Osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* **9**, 654-663.
- Bonewald LF, 2011. The Amazing Osteocyte. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **26**, 229-238.
- Börjesson AE, Windahl SH, Karimian E, Eriksson EE, Lagerquist MK, Engdahl C, Antal MC, Krust A, Chambon P, Sävendahl L, Ohlsson C, 2012. The Role of Estrogen Receptor- α and Its Activation Function-1 for Growth Plate Closure in Female Mice. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **302**, 1381-1389.

- Boskey AL, Maresca M, Ullrich W, Doty SB, Butler WT, Prince CW, 1993. Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel. *Bone Mineralization* **22**, 147-159.
- Boskey AL, Spevak L, Paschalis E, Doty SB, McKee MD, 2002. Osteopontin Deficiency Increases Mineral Content and Mineral Crystallinity in Mouse Bone. *Calcified Tissue International* **71**, 145-154.
- Briggs DC, Hohenester E, 2018. Structural Basis for the Initiation of Glycosaminoglycan Biosynthesis by Human Xylosyltransferase 1. *Structure* **26**, 801-809.
- Brod M, Alolga SL, Beck JF, Wilkinson L, Højbjerg L, Rasmussen MH, 2017. Understanding Burden of Illness for Child Growth Hormone Deficiency. *Quality of Life Research* **26**, 1673-1686.
- Budde BS, Mizumoto S, Kogawa R, Becker C, Altmüller J, Thiele H, Rüschenhoff F, Toliat MR, Kaleschke G, Hämmerle JM, Höhne W, Sugahara K, Nürnberg P, Kennerknecht I, 2015. *Human Genetics* **134**, 691-704.
- Bui C, Huber C, Tuysuz B, Alanay Y, Bole-Feysot C, Leroy JG, Mortier G, Nitschke P, Munnich A, Cormier-Daire V, 2014. XYLT1 Mutations in Desbuquois Dysplasia Type 2. *American Journal of Human Genetics* **94**, 405-14.
- Cadigan KM, Nusse R, 1997. Wnt Signaling: A Common Theme in Animal Development. *Genes & Development* **11**, 3286-3305.
- Caetano-Lopes J, Nery AM, Canhao H, Duarte J, Cascao R, Rodrigues A, Perpetuo IP, Abdulghani S, Amaral PM, Sakaguchi S et al., 2010. Chronic arthritis leads to disturbances in the bone collagen network. *Arthritis Research and Therapy* **12**, R9.
- Campos-Xavier AB, Martinet D, Bateman J, Belluoccio D, Rowley L, Tan TY, Baxová A, Gustavson KH, Borochowitz ZU, Innes AM, Unger S, Beckmann JS, Mittaz L Ballhausen D, Superti-Furga A, Savarirayan R, Bonafé L, 2009. Mutations in the Heparan-Sulfate Proteoglycan Glypican 6 (GPC6) Impair Endochondral Ossification and Cause Recessive Omodysplasia. *American Journal of Human Genetics* **84**, 760-770.
- Canty EG, and Kadler KE, 2005. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *Journal of Cell Sciences* **118**, 1341-1353.
- Cao X, Chen D, 2005. The BMP Signaling and in Vivo Bone Formation. *Gene* **357**, 1-8.
- Capulli M, Paone R, Rucci N, 2014. Osteoblast and Osteocyte: Games without Frontiers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **561**, 3-12.
- Capurro M, Xu P, Shi W, Li F, Jia A, Filmus J, 2008. Glypican-3 Inhibits Hedgehog Signaling during Development by Competing with Patched for Hedgehog Binding. *Developmental Cell* **14**, 700-711.
- Capurro M, Martin T, Shi W, Filmus J, 2014. Glypican-3 Binds to Frizzled and Plays a Direct Role in the Stimulation of Canonical Wnt Signaling. *Journal of Cell Science* **127**, 1565-1575.

- Cartault F, Munier P, Jacquemont ML, Vellayoudom J, Doray B, Payet C, Randrianaivo H, Laville JM, Munnich A, Cormier-Daire V, 2015. Expanding the Clinical Spectrum of B4GALT7 Deficiency: Homozygous p.R270C Mutation with Founder Effect Causes Larsen of Reunion Island Syndrome. *European Journal of Human Genetics: EJHG* **23**, 49-53.
- Cartilage and Its Types: Human Anatomy. <https://www.mananatomy.com/basic-anatomy/cartilage-types>.
- Casado de Frías E, Ruibal JL, Reverte F, Bueno G, 1993. Evolution of Height and Bone Age in Primary Congenital Hypothyroidism. *Clinical Pediatrics* **32**, 426-432.
- Chang J, Sonoyama W, Wang Z, Jin Q, Zhang C, Krebsbach PH, Giannobile W, Shi S, Wang CY, 2007. Noncanonical Wnt4 signaling enhances bone regeneration of mesenchymal stem cells in craniofacial defects through activation p38MAPK. *The Journal of Biological Chemistry* **282**, 30938-30948.
- Chagin AS, Säwendahl L, 2007. Oestrogen Receptors and Linear Bone Growth. *Acta Paediatrica* **96**, 1275-1279.
- Charles JF, Aliprantis AO, 2014. Osteoclasts: More than 'Bone Eaters'. *Trends in Molecular Medicine* **20**, 449-459.
- Chen G, Deng C, Li YP, 2012. TGF- β and BMP Signaling in Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *International Journal of Biological Sciences* **8**, 272-288.
- Chen H, Ghori-Javed FY, Rashid H, Adhami MD, Serra R, Gutierrez SE, Javed A, 2014. Runx2 Regulates Endochondral Ossification through Control of Chondrocyte Proliferation and Differentiation. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **29**, 2653-2665.
- Christian JL, 2012. Morphogen Gradients in Development: From Form to Function. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* **1**, 3-15.
- Chung JH, Kanne JP, Gilman MD, 2011. CT of Diffuse Tracheal Diseases. *American Journal of Roentgenology* **196**, 240-246.
- Chung UI, 2004. Essential Role of Hypertrophic Chondrocytes in Endochondral Bone Development. *Endocrine Journal* **51**, 19-24.
- Church V, 2002. Wnt Regulation of Chondrocyte Differentiation. *Journal of Cell Science* **115**, 4809-4818.
- Clarke B, 2008. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN* **3**, 131-139.
- Cleary MA, van Osch GJ, Brama PA, Hellingman CA, Narcisi R, 2015. FGF, TGF β and Wnt Crosstalk: Embryonic to in Vitro Cartilage Development from Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **9**, 332-342.

- Colnot C, Lu C, Hu D, Helms JA, 2004. Distinguishing the Contributions of the Perichondrium, Cartilage, and Vascular Endothelium to Skeletal Development. *Developmental Biology* **269**, 55-69.
- Colvin JS, Bohne BA, Harding GW, McEwen DG, Ornitz DM, 1996. Skeletal Overgrowth and Deafness in Mice Lacking Fibroblast Growth Factor Receptor 3. *Nature Genetics* **12**, 390-397.
- Corsi A, Xu T, Chen XD, Boyde A, Liang J, Mankani M, Sommer B, Iozzo RV, Eichstetter I, Robey PG, Bianco P, Young MF, 2002. Phenotypic Effects of Biglycan Deficiency Are Linked to Collagen Fibril Abnormalities, Are Synergized by Decorin Deficiency, and Mimic Ehlers-Danlos-like Changes in Bone and Other Connective Tissues. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **17**, 1180-1189.
- Couchman JR, 2003. Syndecans: Proteoglycan Regulators of Cell-Surface Microdomains? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4**, 926-938.
- Couchman JR, Pataki CA, 2012. An Introduction to Proteoglycans and Their Localization. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **60**, 885-897.
- Courtland HW, Sun H, Beth-On M, Wu Y, Elis S, Rosen CJ, Yakar S, 2011. Growth Hormone Mediates Pubertal Skeletal Development Independent of Hepatic IGF-1 Production. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **26**, 761-768.
- Craft AM, Ahmed N, Rockel JS, Baht GS, Alman BA, Kandel RA, Grigoriadis AE, Keller GM, 2013. Specification of Chondrocytes and Cartilage Tissues from Embryonic Stem Cells. *Development* **140**, 2597-2610.
- Crockett JC, Mellis DJ, Scott DI, Helfrich MH, 2011. New Knowledge on Critical Osteoclast Formation and Activation Pathways from Study of Rare Genetic Diseases of Osteoclasts: Focus on the RANK/RANKL Axis. *Osteoporosis International: A Journal Established as Result of Cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* **22**, 1-20.
- Cserjesi P, Brown D, Ligon KL, Lyons GE, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Olson EN, 1995. Scleraxis: A Basic Helix-Loop-Helix Protein That Prefigures Skeletal Formation during Mouse Embryogenesis. *Development* **121**, 1099-1110.
- Danielson KG, Fazio A, Cohen I, Cannizzaro LA, Eichstetter I, Iozzo RV, 1993. The Human Decorin Gene: Intron-Exon Organization, Discovery of Two Alternatively Spliced Exons in the 5' Untranslated Region, and Mapping of the Gene to Chromosome 12q23. *Genomics* **15**, 146-160.
- Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, Iozzo RV, 1997. Targeted Disruption of Decorin Leads to Abnormal Collagen Fibril Morphology and Skin Fragility. *The Journal of Cell Biology* **136**, 729-743.
- Dao DY, Jonason JH, Zhang Y, Hsu W, Chen D, Hilton MJ, O'Keefe RJ, 2012. Cartilage-Specific β -CATENIN Signaling Regulates Chondrocyte Maturation, Generation of Ossification

- Centers, and Perichondrial Bone Formation during Skeletal Development. *Journal of Bone and Mineral Research* **27**, 1680-1694.
- Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS, 2008. The Cell Chemgy of Bone Metabolism. *Journal of Clinical Pathology* **61**, 577-587.
- Deng A, Zhang H, Hu M, Liu S, Wang Y, Gao Q, Guo C, 2018. The Inhibitory Roles of Ihh Downregulation on Chondrocyte Growth and Differentiation. *Experimental and Therapeutic Medicine* **15**, 789-794.
- Deng C, Wynshaw-Boris A, Zhou F, Kuo A, Leder P, 1996. Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Is a Negative Regulator of Bone Growth. *Cell* **84**, 911-921.
- Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS, 2001. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *Journal of Clinical Investigations* **107**, 1055-1061.
- Devlin RD, Du Z, Pereira RC, Kimble RB, Economides AN, Jorgetti V, Canalis E, 2003. Skeletal Overexpression of Noggin Results in Osteopenia and Reduced Bone Formation. *Endocrinology* **144**, 1972-1978.
- Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW, 2009. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science* **324**, 1673-1677.
- Dodds GS, 1930. Row Formation and Other Types of Arrangement of Cartilage Cells in Endochondral Ossification. *The Anatomical Record* **46**, 385-399.
- Domowicz MS, Cortes M, Henry JG, Schwartz NB, 2009. Aggrecan Modulation of Growth Plate Morphogenesis. *Developmental Biology* **329**, 242-257.
- Driscoll P, 2006. Gray's Anatomy, 39th Edition. *Emergency Medicine Journal: EMJ* **23**, 492.
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G, 1997. *Osf2/Cbfa1*: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation. *Cell* **89**, 747-754.
- Eames BF, Yan YL, Swartz ME, Levic DS, Knapik EW, Postlethwait JH, Kimmel CB, 2011. Mutations in *Fam20b* and *Xylt1* Reveal That Cartilage Matrix Controls Timing of Endochondral Ossification by Inhibiting Chondrocyte Maturation. *PLOS Genetics* **7**, e1002246.
- Eickelberg O, Centrella M, Reiss M, Kashgarian M, Wells RG, 2002. Betaglycan Inhibits TGF-Beta Signaling by Preventing Type I-Type II Receptor Complex Formation. Glycosaminoglycan Modifications Alter Betaglycan Function. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 823-829.
- Elefteriou F, Campbell P, Ma Y, 2014. Control of Bone Remodeling by the Peripheral Sympathetic Nervous System. *Calcified Tissue International* **94**, 140-151.
- Everts V, Delaissé JM, Korper W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P, Beertsen W, 2002. The Bone Lining Cell: Its Role in Cleaning Howship's Lacunae and Initiating Bone Formation. *Journal of Bone and Mineral Research* **17**, 77-90.

- Fakhry M, Hamade E, Badran B, Buchet R, Magne D, 2013. Molecular Mechanisms of Mesenchymal Stem Cell Differentiation towards Osteoblasts. *World Journal of Stem Cells* **5**, 136-148.
- Farbod K, Nejadnik MR, Jansen JA, Leeuwenburgh SC, 2014. Interactions Between Inorganic and Organic Phases in Bone Tissue as a Source of Inspiration for Design of Novel Nanocomposites. *Tissue Engineering Part B: Reviews* **20**, 173-188.
- Feng XH, Derynck R, 2005. Specificity and Versatility in Tgf-Beta Signaling through Smads. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **21**, 659-693.
- Fico A, Maina F, Dono R, 2011. Fine-Tuning of Cell Signaling by Glypicans. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* **68**, 923-929.
- Filmus J, Capurro M, 2014. The Role of Glypicans in Hedgehog Signaling. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* **35**, 248-252.
- Filmus J, Capurro M, Rast J, 2008. Glypicans. *Genome Biology* **9**, 224-229.
- Fisher LW, Torchia DA, Fohr B, Young MF, Fedarko NS, 2001. Flexible structure of sibling proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochemical and Biophysics Research Communications* **280**, 460-465.
- Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS, 2015. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Research article. BioMed Research International* **2015**, 1-17.
- Forlino A, Marini JC, 2016. Osteogenesis imperfecta. *Lancet* **387**, 1657-1671.
- Fosang AJ, Neame PJ, Last K, Hardingham TE, Murphy G, Hamilton JA, 1992. The Interglobular Domain of Cartilage Aggrecan Is Cleaved by PUMP, Gelatinases, and Cathepsin B. *The Journal of Biological Chemistry* **267**, 19470-19474.
- Fraichard A, Chassande O, Plateroti M, Roux JP, Trouillas J, Dehay C, Legrand C, Gauthier K, Kedinger M, Malaval L, Rousset B, Samarut J, 1997. The T3R Alpha Gene Encoding a Thyroid Hormone Receptor Is Essential for Post-Natal Development and Thyroid Hormone Production. *The EMBO Journal* **16**, 4412-4420.
- Franzén A, Hultenby K, Reinholt FP, Onnerfjord P, Heinegård D, 2007. Altered Osteoclast Development and Function in Osteopontin Deficient Mice. *Journal of Orthopaedic Research* **26**, 721-728.
- Franz-Odendaal TA, Hall BK, Witten PE, 2006. Buried Alive: How Osteoblasts Become Osteocytes. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* **235**, 176-190.
- Fuki IV, Kuhn KM, Lomazov IR, Rothman VL, Tuszynski GP, Iozzo RV, Swenson TL, Fisher EA, Williams KJ, 1997. The Syndecan Family of Proteoglycans. Novel Receptors Mediating Internalization of Atherogenic Lipoproteins in Vitro. *The Journal of Clinical Investigation* **100**, 1611-1622.

- Gao B, Song H, Bishop K, Elliot G, Garrett L, English MA, Andre P, Robinson J, Sood R, Minami Y, Economides AN, Yang Y, 2011. Wnt Signaling Gradients Establish Planar Cell Polarity by Inducing Vangl2 Phosphorylation through Ror2. *Developmental Cell* **20**, 163-176.
- Gargalionis AN, Basdra EK, Papavassiliou AG, 2017. Polycystins and Mechanotransduction in Bone. *Oncotarget* **8**, 106159-106160.
- Garrison P, Yue S, Hanson J, Baron J, Lui JC, 2017. Spatial Regulation of Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) in Postnatal Articular and Growth Plate Cartilage. *PLOS ONE* **12**, e0176752.
- Gilbert SF, 2000. *Osteogenesis: The Development of Bones*. Developmental Biology. 6th Edition.
- Giustina A, Mazziotti G, Canalis E, 2008. Growth Hormone, Insulin-like Growth Factors, and the Skeleton. *Endocrine Reviews* **29**, 535-559.
- Goldberg M, Septier D, Rapoport O, Iozzo RV, Young MF, Ameye LG, 2005. Targeted Disruption of Two Small Leucine-Rich Proteoglycans, Biglycan and Decorin, Excerpts Divergent Effects on Enamel and Dentin Formation. *Calcified Tissue International* **77**, 297-310.
- Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K, 2006. The Control of Chondrogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry* **97**, 33-44.
- Gori F, Schipani E, Demay MB, 2001. Fibromodulin Is Expressed by Both Chondrocytes and Osteoblasts during Fetal Bone Development. *Journal of Cellular Biochemistry* **82**, 46-57.
- Götting C, Kuhn J, Kleesiek K, 2007. Human Xylosyltransferases in Health and Disease. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* **64**, 1498-1517.
- Götting C, Kuhn J, Sollberg S, Huerkamp C, Brinkmann T, Krieg T, Kleesiek K, 2000. Elevated Serum Xylosyltransferase Activity Correlates with a High Level of Hyaluronate in Patients with Systemic Sclerosis. *Acta Dermato-Venereologica* **80**, 60-61.
- Götting C, Kuhn J, Zahn R, Brinkmann T, Kleesiek K, 2000. Molecular Cloning and Expression of Human UDP-d-Xylose: Proteoglycan Core Protein Beta-d-Xylosyltransferase and Its First Isoform XT-II. *Journal of Molecular Biology* **304**, 517-528.
- Götting C, Sollberg S, Kuhn J, Weilke C, Huerkamp C, Brinkmann T, Krieg T, Kleesiek K, 1999. Serum Xylosyltransferase: A New Biochemical Marker of the Sclerotic Process in Systemic Sclerosis. *The Journal of Investigative Dermatology* **112**, 919-924.
- Götting C, Hendig D, Adam A, Schön S, Schulz V, Szliska C, Kuhn J, Kleesiek K, 2005. Elevated Xylosyltransferase I Activities in Pseudoxanthoma Elasticum (PXE) Patients as a Marker of Stimulated Proteoglycan Biosynthesis. *Journal of Molecular Medicine* **83**, 984-992.
- Götting C, Prante C, Schillinger M, Exner M, Domanovits H, Raith M, Kuhn J, Kleesiek K, 2008. Xylosyltransferase I Variants and Their Impact on Abdominal Aortic Aneurysms. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* **391**, 41-45.
- Govoni KE, Lee SK, Chung YS, Behringer RR, Wergedal JE, Baylink DJ, Mohan S, 2007. Disruption of Insulin-like Growth Factor-I Expression in Type II α I Collagen-Expressing Cells Reduces Bone Length and Width in Mice. *Physiological Genomics* **30**, 354-362.

- Green JD, Tollemar V, Dougherty M, Yan Z, Yin L, Ye J, Collier Z, Mohammed MK, Haydon RC, Luu HH, Kang R, Lee MJ, Ho SH, He TC, Shi LL, Athiviraham A, 2015. Multifaceted Signaling Regulators of Chondrogenesis: Implications in Cartilage Regeneration and Tissue Engineering. *Genes & Diseases* **2**, 307-327.
- Greenblatt MB, Tsai JN, Wein MN, 2017. Bone Turnover Markers in the Diagnosis and Monitoring of Metabolic Bone Disease. *Clinical Chemistry* **63**, 464-474.
- Grimsrud CD, Romano PR, D'Souza M, Puzas JE, Schwarz EM, Reynolds PR, Roiser RN, O'Keefe RJ. 2001. BMP Signaling Stimulates Chondrocyte Maturation and the Expression of Indian Hedgehog. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society* **19**, 18-25.
- Guo J, Chung UI, Kondo H, Bringham FR, Kronenberg HM, 2002. The PTH/PTHrP Receptor Can Delay Chondrocyte Hypertrophy in Vivo without Activating Phospholipase C. *Developmental Cell* **3**, 183-194.
- Guo J, Chung UI, Yang D, Karsenty G, Bringham FR, Kronenberg HM, 2006. PTH/PTHrP Receptor Delays Chondrocyte Hypertrophy via Both Runx2-Dependent and -Independent Pathways. *Developmental Biology* **292**, 16-128.
- Guo L, Elcioglu NH, Iida A, Demirkol YK, Aras S, Matsumoto N, Nishimura G, Miyake N, Ikegawa S, 2017. Novel and Recurrent XYLT1 Mutations in Two Turkish Families with Desbuquois Dysplasia, Type 2. *Journal of Human Genetics* **62**, 447-451.
- Gutch M, Philip R, Philip R, Toms A, Saran S, Gupta KK, 2013. Skeletal Manifestations of Juvenile Hypothyroidism and the Impact of Treatment on Skeletal System. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism* **17**, 181-183.
- Hall BK, Miyake T, 2000. All for One and One for All: Condensations and the Initiation of Skeletal Development." *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* **22**, 138-147.
- Hamidouche Z, Fromigué O, Nuber U, Vaudin P, Pages JC, Ebert R, Jakob F, Miraoui H, Marie PJ, 2010. Autocrine Fibroblast Growth Factor 18 Mediates Dexamethasone-Induced Osteogenic Differentiation of Murine Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Cellular Physiology* **224**, 509-515.
- Hargus G, Kist R, Kramer J, Gerstel D, Neitz A, Scherer G, Rohwedel J, 2008. Loss of Sox9 Function Results in Defective Chondrocyte Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells in Vitro. *The International Journal of Developmental Biology* **52**, 323-332.
- Hartmann C, Tabin CJ, 2000. Dual Roles of Wnt Signaling during Chondrogenesis in the Chicken Limb. *Development* **127**, 3141-3159.
- Hauer NN, Sticht H, Boppudi S, Büttner C, Kraus C, Trautmann U, Zenker M, Zweier C, Wiesener A, Jamra RA, Wieczorek D, Kelkel J, Jung AM, Uebe S, Ekici AB, Rohrer T, Reis A, Dörr HG, Thiel CT, 2017. Genetic Screening Confirms Heterozygous Mutations in ACAN as a Major Cause of Idiopathic Short Stature. *Scientific Reports* **7**, 12225-12230.

- Havens BA, Velonis D, Kronenberg MS, Lichtler AC, Oliver B, Mina M, 2008. Roles of FGFR3 during Morphogenesis of Meckel's Cartilage and Mandibular Bones. *Developmental Biology* **316**, 336-349.
- Heinegård D, Saxne T, 2011. The Role of the Cartilage Matrix in Osteoarthritis. *Nature Reviews. Rheumatology* **7**, 50-56.
- Heinonen J, Taipaleenmäki H, Roering P, Takatalo M, Harkness L, Sandholm J, Uusitalo-Järvinen H, Kassem M, Kiviranta I, Laitala-Leinonen T, Säämänen AM, 2011. Snorc Is a Novel Cartilage Specific Small Membrane Proteoglycan Expressed in Differentiating and Articular Chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage* **19**, 1026-1035.
- Heinonen J, Zhang FP, Surmann-Schmitt C, Honkala S, Stock M, Poutanen M, Säämänen AM, 2017. Defects in Chondrocyte Maturation and Secondary Ossification in Mouse Knee Joint Epiphyses Due to Snorc Deficiency. *Osteoarthritis and Cartilage* **25**, 1132-1142.
- Hilton MJ, Tu X, Long F, 2007. Tamoxifen-Inducible Gene Deletion Reveals a Distinct Cell Type Associated with Trabecular Bone, and Direct Regulation of PTHrP Expression and Chondrocyte Morphology by Ihh in Growth Region Cartilage. *Developmental Biology* **308**, 93-105.
- Hinton RJ, Jing Y, Jing J, Feng JQ, 2017. Roles of Chondrocytes in Endochondral Bone Formation and Fracture Repair. *Journal of Dental Research* **96**, 23-30.
- Hiscock DRR, Caterson B, Flannery CR, 2000. Expression of Hyaluronan Synthases in Articular Cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage* **8**, 120-126.
- Hoffmann HP, Schwartz NB, Rodén L, Prockop DJ, 1984. Location of Xylosyltransferase in the Cisternae of the Rough Endoplasmic Reticulum of Embryonic Cartilage Cells. *Connective Tissue Research* **12**, 151-163.
- Hojo H, Ohba S, Taniguchi K, Shirai M, Yano F, Saito T, Ikeda T, Nakajima K, Komiyama Y, Nakagata N, Suzuki K, Mishina Y, Yamada M, Konno T, Takato T, Kawaguchi H, Kambara H, Chung UI, 2013. Hedgehog-Gli Activators Direct Osteo-Chondrogenic Function of Bone Morphogenetic Protein toward Osteogenesis in the Perichondrium. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 9924-9932.
- Hsieh LT, Nastase MV, Zeng-Brouwers J, Iozzo RV, Schaefer L, 2014. Soluble Biglycan as a Biomarker of Inflammatory Renal Diseases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **0**, 223-235.
- Huang CY, Hagar KL, Frost LE, Sun Y, Cheung HS, 2004. Effects of Cyclic Compressive Loading on Chondrogenesis of Rabbit Bone-Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* **22**, 313-323.
- Huangfu D, Anderson KV, 2006. Signaling from Smo to Ci/Gli: Conservation and Divergence of Hedgehog Pathways from Drosophila to Vertebrates. *Development* **133**, 3-14.
- Hurtado A, Podinin H, Oudega M, Grimpe B, 2008. Deoxyribozyme-Mediated Knockdown of Xylosyltransferase-1 mRNA Promotes Axon Growth in the Adult Rat Spinal Cord. *Brain: A Journal of Neurology* **131**, 2596-2605.

- Hwang HY, Olson SK, Brown JR, Esko JD, Horvitz HR, 2003. The *Caenorhabditis Elegans* Genes *Sqv-2* and *Sqv-6*, Which Are Required for Vulval Morphogenesis, Encode Glycosaminoglycan Galactosyltransferase II and Xylosyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 11735-11738.
- Iozzo RV, Schaefer L, 2015. Proteoglycan Form and Function: A Comprehensive Nomenclature of Proteoglycans. *Matrix Biology* **42**, 11-55.
- Irianto J, Ramaswamy G, Serra R, Knight MM, 2014. Depletion of Chondrocyte Primary Cilia Reduces the Compressive Modulus of Articular Cartilage. *Journal of Biomechanics* **47**, 579-582.
- Jamsheer A, Olech EM, Kozłowski K, Niedziela M, Sowińska-Seidler A, Obara-Moszyńska M, Latos-Bieleńska A, Karczewski M, Zemojtel T, 2016. Exome Sequencing Reveals Two Novel Compound Heterozygous *XYLT1* Mutations in a Polish Patient with Desbuquois Dysplasia Type 2 and Growth Hormone Deficiency. *Journal of Human Genetics* **61**, 577-583.
- Jensen CG, Poole CA, McGlashan SR, Marko M, Issa ZI, Vujcich KV, Bowser SS, 2004. Ultrastructural, Tomographic and Confocal Imaging of the Chondrocyte Primary Cilium in Situ. *Cell Biology International* **28**, 101-110.
- Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC, 1998. Osteoblast Programmed Cell Death (Apoptosis): Modulation by Growth Factors and Cytokines. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **13**, 793-802.
- Jin H, Shen J, Wang B, Wang M, Shu B, Chen D, 2011. TGF- β Signaling Plays an Essential Role in the Growth and Maintenance of Intervertebral Disc Tissue. *FEBS Letters* **585**, 1209-1215.
- Jo SH, Choi YJ, Cho GY, Kim HS, Jung KS, Rhim CY, 2008. Tracheal Calcification. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal* **179**, 291.
- Kalamajski S, Oldberg A, 2010. The Role of Small Leucine-Rich Proteoglycans in Collagen Fibrillogenesis. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* **29**, 248-253.
- Kanazawa I, 2017. Interaction between Bone and Glucose Metabolism. *Endocrine Journal* **64**, 1043-1053.
- Kaneshige M, Suzuki H, Kaneshige K, Cheng J, Wimbrow H, Barlow C, Willingham MC, Cheng S, 2001. A Targeted Dominant Negative Mutation of the Thyroid Hormone Alpha 1 Receptor Causes Increased Mortality, Infertility, and Dwarfism in Mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 15095-15100.
- Kang HY, Chen YJ, Huang KE, Chang C, 2016. Loss of Androgen Receptor Suppresses Chondrogenic Proliferation during Endochondral Ossification in Mice. *Bone Abstract*, P58.
- Kannu P, Bateman JF, Randle S, Cowie S, du Sart D, McGrath S, Edwards M, Savarirayan R, 2010. Premature Arthritis Is a Distinct Type II Collagen Phenotype. *Arthritis & Rheumatism* **62**, 1421-1430.

- Karaplis AC, Luz A, Glowacki J, Bronson RT, Tybulewicz VL, Kronenberg HM, Mulligan RC, 1994. Lethal Skeletal Dysplasia from Targeted Disruption of the Parathyroid Hormone-Related Peptide Gene. *Genes & Development* **8**, 277-289.
- Kawai M, Rosen CJ, 2012. The Insulin-Like Growth Factor System in Bone. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* **41**, 323-333.
- Kearns AE, Campbell SC, Westley J, Schwartz NB, 1991. "Initiation of Chondroitin Sulfate Biosynthesis: A Kinetic Analysis of UDP-D-Xylose: Core Protein beta-D-Xylosyltransferase. *Biochemistry* **30**, 7477-7483.
- Khosla S, Oursler MJ, Monroe DG, 2012. Estrogen and the Skeleton. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* **23**, 576-581.
- Khurana JS, Safadi FF, 2010. Chapter. Bone Structure, Development and Bone Biology. *Essentials in Bone and Soft-Tissue Pathology*, 1-15.
- Kiani C, Chen L, Wu YJ, Yee AJ, Yang BB, 2002. Structure and Function of Aggrecan. *Cell Research* **12**, 19-32.
- Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A, 2009. Selective Activation Mechanisms of Wnt Signaling Pathways. *Trends in Cell Biology* **19**, 119-129.
- Kim JM, Kim J, Kim YH, Kim KT, Ryu SH, Lee TG, Suh PG, 2013. Comparative Secretome Analysis of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells during Osteogenesis. *Journal of Cellular Physiology* **228**, 216-224.
- Kinder SJ, Tsang TE, Quinlan GA, Hadjantonakis AK, Nagy A, Tam PP, 1999. The Orderly Allocation of Mesodermal Cells to the Extraembryonic Structures and the Anteroposterior Axis during Gastrulation of the Mouse Embryo. *Development* **126**, 4691-4701.
- Knight RD, Schilling TF, 2013. Cranial Neural Crest and Development of the Head Skeleton. *Landes Bioscience* **589**, 120-133.
- Kopp P, Kitajima K, Jameson JL, 1996. Syndrome of Resistance to Thyroid Hormone: Insights into Thyroid Hormone Action. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine* **211**, 49-61.
- Koslowski R, Pfeil U, Fehrenbach H, Kasper M, Skutelsky E, Wenzel KW, 2001. Changes in Xylosyltransferase Activity and in Proteoglycan Deposition in Bleomycin-Induced Lung Injury in Rat. *The European Respiratory Journal* **18**, 347-356.
- Koziel L, Wuelling M, Schneider S, Vortkamp A, 2005. Gli3 Acts as a Repressor Downstream of Ihh in Regulating Two Distinct Steps of Chondrocyte Differentiation. *Development* **132**, 5249-5260.
- Kram V, Young MF, 2014. Chapter 8 - Bone Matrix Proteoglycans in Skeletal Function. *Osteogenesis Imperfecta*, 85-95.
- Kresse H, Schönherr E, 2001. Proteoglycans of the Extracellular Matrix and Growth Control. *Journal of Cellular Physiology* **189**, 266-274.

- Krishnan A, Li X, Kao WY, Viker K, Butters K, Masuoka H, Knudsen B, Gores G, Charlton M, 2012. Lumican, an Extracellular Matrix Proteoglycan, Is a Novel Requisite for Hepatic Fibrosis. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* **92**, 1712-1725.
- Krishnan V, Ma Y, Moseley J, Geiser A, Friant S, Frolik C, 2001. Bone Anabolic Effects of Sonic/Indian Hedgehog Are Mediated By BMP-2/4-Dependent Pathways in the Neonatal Rat Metatarsal Model. *Endocrinology* **142**, 940-947.
- Krohn K, Haffner D, Hügel U, Himmele R, Klaus G, Mehls O, Schaefer F, 2003. 1,25(OH)₂D₃ and Dihydrotestosterone Interact to Regulate Proliferation and Differentiation of Epiphyseal Chondrocytes. *Calcified Tissue International* **73**, 400-410.
- Kuo TR, Chen CH, 2017. Bone Biomarker for the Clinical Assessment of Osteoporosis: Recent Developments and Future Perspectives. *Biomarker Research* **5**, 1-9.
- Kuss P, Kraft K, Stumm J, Ibrahim D, Vallecillo-Garcia P, Mundlos S, Stricker S, 2014. Regulation of Cell Polarity in the Cartilage Growth Plate and Perichondrium of Metacarpal Elements by HOXD13 and WNT5A. *Developmental Biology* **385**, 83-93.
- Kvist AJ, Johnson AE, Mörgelin M, Gustafsson E, Bengtsson E, Lindblom K, Aszódi A, Fässler R, Sasaki T, Timpl R, Aspberg A, 2006. Chondroitin Sulfate Perlecan Enhances Collagen Fibril Formation. Implications for Perlecan Chondrodysplasias. *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 33127-33139.
- Lach M, Trzeciak T, Richter M, Pawlicz J, Suchorska WM, 2014. Directed Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells into Chondrogenic Lineages for Articular Cartilage Treatment. *Journal of Tissue Engineering* **5**, 1-9.
- Lairson LL, Henrissat B, Davies GJ, Withers SG, 2008. Glycosyltransferases: Structures, Functions, and Mechanisms. *Annual Review of Biochemistry* **77**, 521-555.
- Lamoureux F, Baud'huin M, Duplomb L, Heymann D, Rédini F, 2007. Proteoglycans: Key Partners in Bone Cell Biology. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* **29**, 758-771.
- Lauing KL, Cortes M, Domowicz MS, Henry JG, Baria AT, Schwartz NB, 2014. Aggrecan Is Required for Growth Plate Cytoarchitecture and Differentiation. *Developmental Biology* **396**, 224-236.
- Lazarus JE, Hegde A, Andrade AC, Nilsson O, Baron J, 2007. Fibroblast Growth Factor Expression in the Postnatal Growth Plate. *Bone* **40**, 577-586.
- Le Goff C, Cormier-Daire V, 2015. Chondrodysplasias and TGF β Signaling. *Bonekey Reports* **4**, 1-7.
- Lee-Thedieck C, Rauch N, Fiammengo R, Klein G, Spatz JP, 2012. Impact of substrate elasticity on human hematopoietic stem and progenitor cell adhesion and motility. *Journal of Cell Science* **125**, 3765-3775.
- Lee HH, Behringer RR, 2007. Conditional Expression of Wnt4 during Chondrogenesis Leads to Dwarfism in Mice. *PLoS ONE* **2**, e450, 1-9.

- Lee K, Deeds JD, Segre GV, 1995. Expression of Parathyroid Hormone-Related Peptide and Its Receptor Messenger Ribonucleic Acids during Fetal Development of Rats. *Endocrinology* **136**, 453-463.
- Lee K, Lanske B, Karaplis AC, Deeds JD, Kohno H, Nissenson RA, Kronenberg HM, Segre GV, 1996. Parathyroid Hormone-Related Peptide Delays Terminal Differentiation of Chondrocytes during Endochondral Bone Development. *Endocrinology* **137**, 5109-5118.
- Leonova EI, Galzitskaya OV, 2013. Structure and Functions of Syndecans in Vertebrates. *Biochemistry. Biokhimiia* **78**, 1071-1085.
- Lewis JL, Krawczak DA, Oegema TR, Westendorf JJ, 2010. Effect of Decorin and Dermatan Sulfate on the Mechanical Properties of a Neocartilage. *Connective Tissue Research* **51**, 159-170.
- Li SW, Prockop DJ, Helminen H, Fässler R, Lapveteläinen T, Kiraly K, Peltarri A, Arokoski J, Lui H, Arita M, 1995. Transgenic Mice with Targeted Inactivation of the Col2 Alpha 1 Gene for Collagen II Develop a Skeleton with Membranous and Periosteal Bone but No Endochondral Bone. *Genes & Development* **9**, 2821-2830.
- Li TF, O'Keefe RJ, Chen D, 2009. TGF- β Signaling in chondrocytes. *Frontiers in Bioscience* **10**, 681-688.
- Li WG, Xu XX, 2005. The Expression of N-Cadherin, Fibronectin during Chondrogenic Differentiation of MSC Induced by TGF-beta (1). *Chinese Journal of Traumatology* **8**, 349-351.
- Li Y, Dudley AT, 2009. Noncanonical Frizzled Signaling Regulates Cell Polarity of Growth Plate Chondrocytes. *Development* **136**, 1083-1092.
- Lindsey RC, Mohan S, 2016. Skeletal Effects of Growth Hormone and Insulin-like Growth Factor-I Therapy. *Molecular and Cellular Endocrinology* **432**, 44-55.
- Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A, 1993. Mice Carrying Null Mutations of the Genes Encoding Insulin-like Growth Factor I (Igf-1) and Type 1 IGF Receptor (Igf1r). *Cell* **75**, 59-72.
- Long F, Ornitz DM, 2013. Development of the Endochondral Skeleton. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **5**, a008334, 1-20.
- Long F, Joeng KS, Xuan S, Efstratiadis A, McMahon AP, 2006. Independent Regulation of Skeletal Growth by Ihh and IGF Signaling. *Developmental Biology* **298**, 327-333.
- López-Casillas F, Cheifetz S, Doody J, Andres JL, Lane WS, Massagué J, 1991. Structure and Expression of the Membrane Proteoglycan Betaglycan, a Component of the TGF-Beta Receptor System. *Cell* **67**, 785-795.
- López-Casillas F, Payne HM, Andres JL, Massagué J, 1994. Betaglycan Can Act as a Dual Modulator of TGF-Beta Access to Signaling Receptors: Mapping of Ligand Binding and GAG Attachment Sites. *The Journal of Cell Biology* **124**, 557-568.

- Lowe DA, Lepori-Bui N, Fomin PV, Sloofman LG, Zhou X, Farach-Carson MC, Wang L, Kirn-Safran CB, 2014. Deficiency in Perlecan/HSPG2 During Bone Development Enhances Osteogenesis and Decreases Quality of Adult Bone in Mice. *Calcified Tissue International* **95**, 29-38.
- Lu C, Huang S, Miclau T, Helms JA, Colnot C, 2004. Mepe is expressed during skeletal development and regeneration. *Histochemical Cell Biology* **121**, 493-499.
- Ma B, Landman EB, Miclea RL, Wit JM, Robanus-Maandag EC, Post JN, Karperien M, 2013. WNT Signaling and Cartilage: Of Mice and Men. *Calcified Tissue International* **92**, 399-411.
- Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M, 2008. Endochondral Ossification: How Cartilage Is Converted into Bone in the Developing Skeleton. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **40**, 46-62.
- MacLean HE, Kronenberg HM, 2005. Localization of Indian Hedgehog and PTH/PTHrP Receptor Expression in Relation to Chondrocyte Proliferation during Mouse Bone Development. *Development, Growth & Differentiation* **47**, 59-63.
- Macri L, Silverstein D, Clark RA, 2007. Growth Factor Binding to the Pericellular Matrix and Its Importance in Tissue Engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* **59**, 1366-1381.
- Maeda N, 2015. Proteoglycans and Neuronal Migration in the Cerebral Cortex during Development and Disease. *Frontiers in Neuroscience* **9**, 1-15.
- Maeda Y, Nakamura E, Nguyen MT, Suva LJ, Swain FL, Razzaque MS, Mackem S, Lanske B, 2007. Indian Hedgehog Produced by Postnatal Chondrocytes Is Essential for Maintaining a Growth Plate and Trabecular Bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 6382-6387.
- Mahley RW, Huang Y, 2007. Atherogenic Remnant Lipoproteins: Role for Proteoglycans in Trapping, Transferring, and Internalizing. *Journal of Clinical Investigation* **117**, 94-98.
- Mak KK, Chen MH, Day TF, Chuang PT, Yang Y, 2006. Wnt/Beta-Catenin Signaling Interacts Differentially with Ihh Signaling in Controlling Endochondral Bone and Synovial Joint Formation. *Development* **133**, 3695-3707.
- Malfait F, Kariminejad A, Van Damme T, Gauche C, Syx D, Merhi-Soussi F, Gulberti S, Symoens S, Vanhauwaert S, Willaert A, Bozorgmehr B, Kariminejad MH, Ebrahimiadib N, Hausser I, Huyseune A, Fournel-Gigleux S, De Paepe A, 2013. Defective Initiation of Glycosaminoglycan Synthesis Due to B3GALT6 Mutations Causes a Pleiotropic Ehlers-Danlos-Syndrome-like Connective Tissue Disorder. *American Journal of Human Genetics* **92**, 935-945.
- Mansour A, Abou-Ezzi G, Sitnicka E, Jacobsen SE, Wakkach A, Blin-Wakkach C, 2012. Osteoclasts Promote the Formation of Hematopoietic Stem Cell Niches in the Bone Marrow. *The Journal of Experimental Medicine* **209**, 537-549.
- Markmann A, Hausser H, Schönherr E, Kresse H, 2000. Influence of Decorin Expression on Transforming Growth Factor-Beta-Mediated Collagen Gel Retraction and Biglycan Induction. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* **19**, 631-636.

- Matic I, Matthews BG, Wang X, Dymont NA, Worthley DL, Rowe DW, Grcevic D, Kalajzic I, 2016. Quiescent Bone Lining Cells Are a Major Source of Osteoblasts During Adulthood. *Stem Cells* **34**, 2930-2942.
- Matsumoto K, Kamiya N, Suwan K, Atsumi F, Shimizu K, Shinomura T, Yamada Y, Kimata K, Watanabe H, 2006. Identification and Characterization of Versican/Pg-M Aggregates in Cartilage. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 18257-18263.
- Matsunaga S, Yamamoto T, Fukumura K, 1999. Temporal and Spatial Expressions of Transforming Growth Factor-Betas and Their Receptors in Epiphyseal Growth Plate. *International Journal of Oncology* **14**, 1063-1067.
- Mau E, Whetstone H, Yu C, Hopyan S, Wunder JS, Alman BA, 2007. PTHrP Regulates Growth Plate Chondrocyte Differentiation and Proliferation in a Gli3 Dependent Manner Utilizing Hedgehog Ligand Dependent and Independent Mechanisms. *Developmental Biology* **305**, 28-39.
- McDonnell P, McHugh PE, O'Mahoney D, 2007. Vertebral Osteoporosis and Trabecular Bone Quality. *Annals of Biomedical Engineering* **35**, 170-189.
- McGlashan SR, Haycraft CJ, Jensen CG, Yoder BK, Poole CA, 2007. Articular Cartilage and Growth Plate Defects Are Associated with Chondrocyte Cytoskeletal Abnormalities in Tg737orpk Mice Lacking the Primary Cilia Protein Polaris. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* **26**, 234-246.
- McGlashan SR, Jensen CG, Poole CA, 2006. Localization of Extracellular Matrix Receptors on the Chondrocyte Primary Cilium. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* **54**, 1005-1014.
- Miao D, Li J, Xue Y, Su H, Karaplis AC, Goltzman D, 2004. Parathyroid Hormone-Related Peptide Is Required for Increased Trabecular Bone Volume in Parathyroid Hormone-Null Mice. *Endocrinology* **145**, 3554-3562.
- Minina E, Wenzel HM, Kreschel C, Karp S, Gaffield W, McMahan AP, Vortkamp A, 2001. BMP and Ihh/PTHrP Signaling Interact to Coordinate Chondrocyte Proliferation and Differentiation. *Development* **128**, 4523-4534.
- Minina E, Kreschel C, Naski MC, Ornitz DM, Vortkamp A, 2002. Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP Signaling Integrates Chondrocyte Proliferation and Hypertrophic Differentiation. *Developmental Cell* **3**, 439-449.
- Mirtz TA, Chandler JP, Eysers CM, 2011. The Effects of Physical Activity on the Epiphyseal Growth Plates: A Review of the Literature on Normal Physiology and Clinical Implications. *Journal of Clinical Medicine Research* **3**, 1-7.
- Mis EK, Liem KF, Kong Y, Schwartz NB, Domowicz M, Weatherbee SD, 2014. Forward Genetics Defines Xylt1 as a Key, Conserved Regulator of Early Chondrocyte Maturation and Skeletal Length. *Developmental Biology* **385**, 67-82.
- Miyazono K, Maeda S, Imamura T, 2004. Coordinate Regulation of Cell Growth and Differentiation by TGF-Beta Superfamily and Runx Proteins. *Oncogene* **23**, 4232-4237.

- Moncada RM, Venta LA, Venta ER, Fareed J, Walenga JM, Messmore HL, 1992. Tracheal and Bronchial Cartilaginous Rings: Warfarin Sodium-Induced Calcification. *Radiology* **184**, 437-439.
- Montero A, Okada Y, Tomita M, Ito M, Tsurukami H, Nakamura T, Doetschman T, Coffin JD, Hurley MM, 2000. Disruption of the Fibroblast Growth Factor-2 Gene Results in Decreased Bone Mass and Bone Formation. *The Journal of Clinical Investigation* **105**, 1085-1093.
- Moore ER, Jacobs CR, 2018. The Primary Cilium as a Signaling Nexus for Growth Plate Function and Subsequent Skeletal Development. *Journal of Orthopaedic Research* **36**, 533-545.
- Morgan MR, Humphries MJ, Bass MD, 2007. Synergistic Control of Cell Adhesion by Integrins and Syndecans. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **8**, 957-969.
- Müller B, Prante C, Gastens M, Kuhn J, Kleesiek K, Götting C, 2008. Increased Levels of Xylosyltransferase I Correlate with the Mineralization of the Extracellular Matrix during Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* **27**, 139-149.
- Müller S, Disse J, Schöttler M, Schön S, Prante C, Brinkmann T, Kuhn J, Kleesiek K, Götting C, 2006. Human Xylosyltransferase I and N-Terminal Truncated Forms: Functional Characterization of the Core Enzyme. *Biochemical Journal* **394**, 163-171.
- Müller S, Schöttler M, Schön S, Prante C, Brinkmann T, Kuhn J, Götting C, Kleesiek K, 2005. Human Xylosyltransferase I: Functional and Biochemical Characterization of Cysteine Residues Required for Enzymic Activity. *The Biochemical Journal* **386**, 227-236.
- Mythreye K, Blobel GC, 2009. Proteoglycan Signaling Co-Receptors: Roles in Cell Adhesion, Migration and Invasion. *Cellular Signalling* **21**, 1548-1558.
- Nakajima M, Mizumoto S, Miyake N, Kogawa R, Iida A, Ito H, Kitoh H, Hirayama A, Mitsubuchi H, Miyazaki O, Kosaki R, Horikawa R, Lai A, Mendoza-Londono R, Dupuis L, Chitayat D, Howard A, Leal GF, Cavalcanti D, Tsurusaki Y, Saitsu H, Watanabe S, Lausch E, Unger S, Bonafé L, Ohashi H, Superti-Furga A, Matsumoto N, Sugahara K, Nishimura G, Ikegawa S, 2013. Mutations in B3GALT6, Which Encodes a Glycosaminoglycan Linker Region Enzyme, Cause a Spectrum of Skeletal and Connective Tissue Disorders. *American Journal of Human Genetics* **92**, 927-934.
- Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, Harada Y, Azuma Y, Krust A, Yamamoto Y, Nishina H, Takeda S, Takayanagi H, Metzger D, Kanno J, Takaoka K, Martin TJ, Chambon P, Kato S, 2007. Estrogen Prevents Bone Loss via Estrogen Receptor Alpha and Induction of Fas Ligand in Osteoclasts. *Cell* **130**, 811-823.
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B, 2002. The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Cell* **108**, 17-29.
- Naski MC, Wang Q, Xu J, Ornitz DM, 1996. Graded Activation of Fibroblast Growth Factor Receptor 3 by Mutations Causing Achondroplasia and Thanatophoric Dysplasia. *Nature Genetics* **13**, 233-237.

- Nastase MV, Young MF, Schaefer L, 2012. Biglycan: A Multivalent Proteoglycan Providing Structure and Signals. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* **60**, 963-975.
- Neill T, Schaefer L, Iozzo RV, 2015. Decoding the Matrix: Instructive Roles of Proteoglycan Receptors. *Biochemistry* **54**, 4583-4598.
- Ni GX, Li Z, Zhou YZ, 2014. The Role of Small Leucine-Rich Proteoglycans in Osteoarthritis Pathogenesis. *Osteoarthritis and Cartilage* **22**, 896-903.
- Nikitovic D, Aggelidakis J, Young MF, Iozzo RV, Karamanos NK, Tzanakakis GN, 2012. The Biology of Small Leucine-Rich Proteoglycans in Bone Pathophysiology. *The Journal of Biological Chemistry* **287**, 33926-33933.
- Nilsson O, Marino R, De Luca F, Phillip M, Baron J, 2005. Endocrine Regulation of the Growth Plate. *Hormone Research* **64**, 157-165.
- Noble BS, Stevens H, Loveridge N, Reeve J, 1997. Identification of Apoptotic Changes in Osteocytes in Normal and Pathological Human Bone. *Bone* **20**, 273-282.
- Nowlan NC, Sharpe J, Roddy KA, Prendergast PJ, Murphy P, 2010. Mechanobiology of Embryonic Skeletal Development: Insights from Animal Models. *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today: Reviews* **90**, 203-213.
- Oberbauer AM, Peng R, 1995. Growth Hormone and IGF-I Stimulate Cell Function in Distinct Zones of the Rat Epiphyseal Growth Plate. *Connective Tissue Research* **31**, 189-195.
- Olsen BR, Berendsen AD, Duan X, Hu K, Nagao M, 2017. Roles of Vascular Endothelial Growth Factor in Skeletal Development, Postnatal Homeostasis and Disease. *The FASEB Journal* **31**, 15.1-15.1.
- Ornitz DM, Itoh N, 2001. Fibroblast Growth Factors. *Genome Biology* **2**, 3005.1-3005.12.
- Ornitz DM, Itoh N, 2015. The Fibroblast Growth Factor Signaling Pathway. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology* **4**, 215-266.
- Ornitz DM, Marie PJ, 2002. FGF Signaling Pathways in Endochondral and Intramembranous Bone Development and Human Genetic Disease. *Genes & Development* **16**, 1446-1465.
- Ornitz DM, Marie PJ, 2015. Fibroblast Growth Factor Signaling in Skeletal Development and Disease. *Genes & Development* **29**, 1463-1486.
- Ortuño MJ, Ruiz-Gaspà S, Rodríguez-Carballo E, Susperregui AR, Bartrons R, Rosa JL, Ventura F, 2010. P38 Regulates Expression of Osteoblast-Specific Genes by Phosphorylation of Osterix. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 31985-31994.
- Otto Chen XD, Shi S, Xu T, Robey PG, Young MF, 2002. Age-Related Osteoporosis in Biglycan-Deficient Mice Is Related to Defects in Bone Marrow Stromal Cells. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **17**, 331-340.
- Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ, 1997. Cbfa1, a Candidate Gene for

- Cleidocranial Dysplasia Syndrome, Is Essential for Osteoblast Differentiation and Bone Development. *Cell* **89**, 765-771.
- Pacifici M, Shimo T, Gentili C, Kirsch T, Freeman TA, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, Koyama E, 2005. Syndecan-3: A Cell-Surface Heparan Sulfate Proteoglycan Important for Chondrocyte Proliferation and Function during Limb Skeletogenesis. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* **23**, 191-199.
- Pap T, Bertrand J, 2013. Syndecans in Cartilage Breakdown and Synovial Inflammation. *Nature Reviews. Rheumatology* **9**, 43-55.
- Papadopoulou AK, Papachristou DJ, Chatzopoulos SA, Pirttiniemi P, Papavassiliou AG, Basdra EK, 2007. Load Application Induces Changes in the Expression Levels of Sox-9, FGFR-3 and VEGF in Condylar Chondrocytes. *FEBS Letters* **581**, 2041-2046.
- Patterson-kane JC, Firth EC, 2014. Chapter 13 - Tendon, Ligament, Bone, and Cartilage: Anatomy, Physiology, and Adaptations to Exercise and Training. *The Athletic Horse (Second Edition)*, 202-242.
- Poole CA, Flint MH, Beaumont BW, 1985. Analysis of the Morphology and Function of Primary Cilia in Connective Tissues: A Cellular Cybernetic Probe? *Cell Motility* **5**, 175-193.
- Prante C, Bieback K, Funke C, Schön S, Kern S, Kuhn J, Gastens M, Kleesiek K, Götting C, 2006. The Formation of Extracellular Matrix during Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Correlates with Increased Levels of Xylosyltransferase I. *Stem Cells* **24**, 2252-2261.
- Pratta MA, Yao W, Decicco C, Tortorella MD, Liu RQ, Copeland RA, Magolda R, Newton RC, Trzaskos JM, Arner EC, 2003. Aggrecan Protects Cartilage Collagen from Proteolytic Cleavage. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 45539-45545.
- Prein C, Warmbold N, Farkas Z, Schieker M, Aszodi A, Clausen-Schaumann H, 2016. Structural and Mechanical Properties of the Proliferative Zone of the Developing Murine Growth Plate Cartilage Assessed by Atomic Force Microscopy. *Matrix Biology* **50**, 1-15.
- Prydz K, Dalen KT, 2000. Synthesis and Sorting of Proteoglycans. *Journal of Cell Science* **113**, 193-205.
- Randall RM, Shao YY, Wang L, Ballock RT, 2012. Activation of Wnt Planar Cell Polarity (PCP) signaling promotes growth plate column formation in vitro. *Journal of Orthopaedic Research* **30**, 1906-1914.
- Radhakrishnan R, Lewis NT, Mao JJ, 2004. Zone-specific micromechanical properties of the extracellular matrices of growth plate cartilage. *Annals of Biomedical Engineering* **32**, 284-291.
- Raggatt LJ, Partridge NC, 2010. Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 25103-25108.
- Raouf A, Seth A, 2002. Discovery of Osteoblast-Associated Genes Using cDNA Microarrays. *Bone* **30**, 463-471.

- Raouf A, Ganss B, McMahon C, Vary C, Roughley PJ, Seth A, 2002. Lumican Is a Major Proteoglycan Component of the Bone Matrix. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* **21**, 361-367.
- Rapraeger AC, 2001. Molecular Interactions of Syndecans during Development. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **12**, 107-116.
- Rhee N, Jeong K, Yang EM, Kim CJ, 2014. Gigantism Caused by Growth Hormone Secreting Pituitary Adenoma. *Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism* **19**, 96-99.
- Rivas AM, Lado-Abeal J, 2016. Thyroid Hormone Resistance and Its Management. *Proceedings (Bayl Univ Med Cent)* **29**, 209-211.
- Roberts CR, Paré PD, 1991. Composition Changes in Human Tracheal Cartilage in Growth and Aging, Including Changes in Proteoglycan Structure. *The American Journal of Physiology* **261**, 92-101.
- Robling AG, Castillo AB, Turner CH, 2006. Biomechanical and Molecular Regulation of Bone Remodeling. *Annual Review of Biomedical Engineering* **8**, 4554-4598.
- Roddy KA, Prendergast PJ, Murphy P, 2011. Mechanical Influences on Morphogenesis of the Knee Joint Revealed through Morphological, Molecular and Computational Analysis of Immobilised Embryos. *PLoS ONE* **6**, 1-14.
- Roden L, 1980. Structure and Metabolism of Connective Tissue Proteoglycans. *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans* **79**, 31-37.
- Rossi A, Kaitila I, Wilcox WR, Rimoin DL, Steinmann B, Cetta G, Superti-Furga A, 1998. Proteoglycan Sulfation in Cartilage and Cell Cultures from Patients with Sulfate Transporter Chondrodysplasias: Relationship to Clinical Severity and Indications on the Role of Intracellular Sulfate Production. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* **17**, 361-369.
- Roughley PJ, 2006. The structure and function of cartilage proteoglycans. *European Cells & Materials* **12**, 92-101.
- Roughley PJ, Mort JS, 2014. The Role of Aggrecan in Normal and Osteoarthritic Cartilage. *Journal of Experimental Orthopaedics* **1**, 1-11.
- Rucci N, 2008. Molecular Biology of Bone Remodelling. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism* **5**, 49-56.
- Rukavina I, Mortier G, Van Laer L, Frković M, Đapić T, Jelušić M, 2014. Mutation in the Type II Collagen Gene (COL2A1) as a Cause of Primary Osteoarthritis Associated with Mild Spondyloepiphyseal Involvement. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* **44**, 101-104.
- Saad FA, Salih E, Glimcher MJ, 2008. Identification of Osteopontin Phosphorylation Sites Involved in Bone Remodeling and Inhibition of Pathological Calcification. *Journal of Cellular Biochemistry* **103**, 852-856.

- Salminen-Mankonen H, Säämänen AM, Jalkanen M, Vuorio E, Pirilä L, 2005. Syndecan-1 Expression Is Upregulated in Degenerating Articular Cartilage in a Transgenic Mouse Model for Osteoarthritis. *Scandinavian Journal of Rheumatology* **34**, 469-474.
- Salmon CR, Tomazela DM, Ruiz KG, Foster BL, Paes Leme AF, Sallum EA, Somerman MJ, Nociti FH Jr, 2013. Proteomic Analysis of Human Dental Cementum and Alveolar Bone. *Journal of Proteomics* **91**, 544-555.
- Sato T, Kudo T, Ikehara Y, Ogawa H, Hirano T, Kiyohara K, Hagiwara K, Togayachi A, Ema M, Takahashi S, Kimata K, Watanabe H, Narimatsu H, 2011. Chondroitin Sulfate N-Acetylgalactosaminyltransferase 1 Is Necessary for Normal Endochondral Ossification and Aggrecan Metabolism. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 5803-5812.
- Schaefer L, Iozzo RV, 2008. Biological Functions of the Small Leucine-Rich Proteoglycans: From Genetics to Signal Transduction. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 21305-21309.
- Schön S, Prante C, Bahr C, Kuhn J, Kleesiek K, Götting C, 2006. Cloning and Recombinant Expression of Active Full-Length Xylosyltransferase I (XT-I) and Characterization of Subcellular Localization of XT-I and XT-II. *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 14224-14231.
- Schön S, Prante C, Bahr C, Tarnow L, Kuhn J, Kleesiek K, Götting C, 2006. The Xylosyltransferase I Gene Polymorphism c.343G>T (p.A125S) Is a Risk Factor for Diabetic Nephropathy in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* **29**, 2295-2299.
- Schön S, Prante C, Müller S, Schöttler M, Tarnow L, Kuhn J, Kleesiek K, Götting C, 2005. Impact of Polymorphisms in the Genes Encoding Xylosyltransferase I and a Homologue in Type 1 Diabetic Patients with and without Nephropathy. *Kidney International* **68**, 1483-1490.
- Schreml J, Durmaz B, Cogulu O, Keupp K, Beleggia F, Pohl E, Milz E, Coker M, Ucar SK, Nürnberg G, Nürnberg P, Kuhn J, Ozkinay F, 2014. The Missing 'Link': An Autosomal Recessive Short Stature Syndrome Caused by a Hypofunctional XYLT1 Mutation. *Human Genetics* **133**, 29-39.
- Seidler DG, 2012. The Galactosaminoglycan-Containing Decorin and Its Impact on Diseases. *Current Opinion in Structural Biology* **22**, 578-582.
- Seki K, Hata A, 2004. Indian Hedgehog Gene Is a Target of the Bone Morphogenetic Protein Signaling Pathway. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 18544-18549.
- Shao YY, Wang L, Ballock RT, 2006. Thyroid Hormone and the Growth Plate. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* **7**, 265-271.
- Shim KS, 2015. Pubertal Growth and Epiphyseal Fusion. *Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism* **20**, 8-12.
- Shimizu H, Yokoyama S, Asahara H, 2007. Growth and Differentiation of the Developing Limb Bud from the Perspective of Chondrogenesis. *Development, Growth & Differentiation* **49**, 449-454.

- Shwartz Y, Farkas Z, Stern T, Aszódi A, Zelzer E, 2012. Muscle Contraction Controls Skeletal Morphogenesis through Regulation of Chondrocyte Convergent Extension. *Developmental Biology* **370**, 154-163.
- Siddiqui JA, Partridge NC, 2016. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. *Physiology* **31**, 233-245.
- Silveira C, Leal GF, Cavalcanti DP, 2016. Desbuquois Dysplasia Type II in a Patient with a Homozygous Mutation in *XYLT1* and New Unusual Findings. *American Journal of Medical Genetics* **170**, 3043-3047.
- Sobacchi C, Schulz A, Coxon FP, Villa A, Helfrich MH, 2013. Osteopetrosis: Genetics, Treatment and New Insights into Osteoclast Function. *Nature Reviews. Endocrinology* **9**, 522-536.
- Sodek J, Ganss B, Mckee MD, 2000. Osteopontin. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* **11**, 279-303.
- Song B, Haycraft CJ, Seo HS, Yoder BK, Serra R, 2007. Development of the Post-Natal Growth Plate Requires Intraflagellar Transport Proteins. *Developmental Biology* **305**, 202-216.
- Song HH, Shi W, Xiang YY, Filmus J, 2005. The Loss of Glypican-3 Induces Alterations in Wnt Signaling. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 2116-2125.
- Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA, 2009. The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function. *Sports Health: A Multidisciplinary Approach* **1**, 461-468.
- Šošić D, Brand-Saberi B, Schmidt C, Christ B, Olson EN, 1997. Regulation of Paraxis Expression and Somite Formation by Ectoderm- and Neural Tube-Derived Signals. *Developmental Biology* **185**, 229-243.
- Staines KA, MacRae VE, Farquharson C, 2012. The importance of the SIBLING family of proteins on skeletal mineralisation and bone remodelling. *The journal of Endocrinology* **214**, 241-255.
- Stark Z, Savarirayan R, 2009. Osteopetrosis. *Orphanet Journal of Rare Diseases* **4**, 1-12.
- St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP, 1999. Indian Hedgehog Signaling Regulates Proliferation and Differentiation of Chondrocytes and Is Essential for Bone Formation. *Genes & Development* **13**, 2072-2086.
- Su N, Sun Q, Li C, Lu X, Qi H, Chen S, Yang J, Du X, Zhao L, He Q, Jin M, Shen Y, Chen D, Chen L, 2010. Gain-of-Function Mutation in *FGFR3* in Mice Leads to Decreased Bone Mass by Affecting Both Osteoblastogenesis and Osteoclastogenesis. *Human Molecular Genetics* **19**, 1199-1210.
- Svensson L, Närlid I, Oldberg A, 2000. Fibromodulin and Lumican Bind to the Same Region on Collagen Type I Fibrils. *FEBS Letters* **470**, 178-182.
- Sze JH, Brownlie JC, Love CA, 2016. Biotechnological Production of Hyaluronic Acid: A Mini Review. *3 Biotech* **6**, 1-9.

- Tahimic CG, Wang Y, Bikle DD, 2013. Anabolic Effects of IGF-1 Signaling on the Skeleton. *Frontiers in Endocrinology* **4**, 1-14.
- Takano-Yamamoto T, 2014. Osteocyte Function under Compressive Mechanical Force. *Japanese Dental Science Review* **50**, 29-39.
- Tamamura Y, Otani T, Kanatani N, Koyama E, Kitagaki J, Komori T, Yamada Y, Costantini F, Wakisaka S, Pacifici M, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M, 2005. Developmental Regulation of Wnt/Beta-Catenin Signals Is Required for Growth Plate Assembly, Cartilage Integrity, and Endochondral Ossification. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 19185-19195.
- Teitelbaum SL, Ross FP, 2003. Genetic Regulation of Osteoclast Development and Function. *Nature Reviews Genetics* **4**, 638-649.
- Teti A, 2013. Mechanisms of Osteoclast-Dependent Bone Formation. *BoneKEY Reports* **2**. 1-6.
- Tree DR, Ma D, Axelrod JD, 2002. A Three-Tiered Mechanism for Regulation of Planar Cell Polarity. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **13**, 217-224.
- Tsang KY, Chan D, Cheah KS, 2015. Fate of Growth Plate Hypertrophic Chondrocytes: Death or Lineage Extension? *Development, Growth & Differentiation* **57**, 179-192.
- Tuli R, Tuli S, Nandi S, Huang X, Manner PA, Hozack WJ, Danielson KG, Hall DJ, Tuan RS, 2003. Transforming Growth Factor-Beta-Mediated Chondrogenesis of Human Mesenchymal Progenitor Cells Involves N-Cadherin and Mitogen-Activated Protein Kinase and Wnt Signaling Cross-Talk. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 41227-41236.
- Van der Kraan PM, Blaney Davidson EN, Blom A, van den Berg WB, 2009. TGF-Beta Signaling in Chondrocyte Terminal Differentiation and Osteoarthritis: Modulation and Integration of Signaling Pathways through Receptor-Smads. *Osteoarthritis and Cartilage* **17**, 1539-1545.
- Van Koningsbruggen S, Knoester H, Bakx R, Mook O, Knegt L, Cobben JM, 2016. Complete and Partial XYLT1 Deletion in a Patient with Neonatal Short Limb Skeletal Dysplasia. *American Journal of Medical Genetics, part A* **170**, 510-514.
- Venkatesan N, Barré L, Bourhim M, Magdalou J, Mainard D, Netter P, Fournel-Gigleux S, Ouzzine M, 2012. Xylosyltransferase-I Regulates Glycosaminoglycan Synthesis during the Pathogenic Process of Human Osteoarthritis. *PloS One* **7**, 1-9.
- Venkatesan N, Barré L, Magdalou J, Mainard D, Netter P, Fournel-Gigleux S, Ouzzine M, 2009. Modulation of Xylosyltransferase I Expression Provides a Mechanism Regulating Glycosaminoglycan Chain Synthesis during Cartilage Destruction and Repair. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **23**, 813-822.
- Vernier RL, Steffes MW, Sisson-Ross S, Mauer SM, 1992. Heparan Sulfate Proteoglycan in the Glomerular Basement Membrane in Type 1 Diabetes Mellitus. *Kidney International* **41**, 1070-1080.
- Viguet-Carrin S, Garnero P, Delmas PD, 2006. The Role of Collagen in Bone Strength. *Osteoporosis International: A Journal Established as Result of Cooperation between the*

- European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA **17**, 319-336.
- Viola M, Vigetti D, Genasetti A, Rizzi M, Karousou E, Moretto P, Clerici M, Bartolini B, Pallotti F, De Luca G, Passi A, 2008. Molecular Control of the Hyaluronan Biosynthesis. *Connective Tissue Research* **49**, 111-114.
- Vogl-Willis CA, Edwards IJ, 2004. High-Glucose-Induced Structural Changes in the Heparan Sulfate Proteoglycan, Perlecan, of Cultured Human Aortic Endothelial Cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1672**, 36-45.
- Vynios DH, 2014. Metabolism of Cartilage Proteoglycans in Health and Disease. Research article. *BioMed Research International* **2014**, 1-9.
- Wallace JM, Rajachar RM, Chen XD, Shi S, Allen MR, Bloomfield SA, Les CM, Robey PG, Young MF, Kohn DH, 2006. The Mechanical Phenotype of Biglycan-Deficient Mice Is Bone- and Gender-Specific. *Bone* **39**, 106-116.
- Walsh JS, 2015. Normal Bone Physiology, Remodelling and Its Hormonal Regulation. *Surgery (Oxford)* **33**, 1-6.
- Wang F, Flanagan J, Su N, Wang LC, Bui S, Nielson A, Wu X, Vo HT, Ma XJ, Luo Y, 2012. RNAscope: A Novel in Situ RNA Analysis Platform for Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues. *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD* **14**, 22–29.
- Wang Y, Nishida S, Sakata T, Elalieh HZ, Chang W, Halloran BP, Doty SB, Bikle DD, 2006. Insulin-Like Growth Factor-I Is Essential for Embryonic Bone Development. *Endocrinology* **147**, 4753-4761.
- Watanabe H, Cheung SC, Itano N, Kimata K, Yamada Y, 1997. Identification of Hyaluronan-Binding Domains of Aggrecan. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 28057-28065.
- Watanabe H, Yamada Y, Kimata K, 1998. Roles of Aggrecan, a Large Chondroitin Sulfate Proteoglycan, in Cartilage Structure and Function. *Journal of Biochemistry* **124**, 687-693.
- Wen X, Li X, Tang Y, Tang J, Zhou S, Xie Y, Guo J, Yang J, Du X, Su N, Chen L, 2016. Chondrocyte FGFR3 Regulates Bone Mass by Inhibiting Osteogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* **291**, 24912-24921.
- Wiater E, Harrison CA, Lewis KA, Gray PC, Vale WW, 2006. Identification of Distinct Inhibin and Transforming Growth Factor Beta-Binding Sites on Betaglycan: Functional Separation of Betaglycan Co-Receptor Actions. *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 17011-17022.
- Wilsman NJ, Farnum CE, Hilley HD, Carlson CS, 1981. Ultrastructural Evidence of a Functional Heterogeneity among Physeal Chondrocytes in Growing Swine. *American Journal of Veterinary Research* **42**, 1547-1553.
- Wilson IB, 2004. The Never-Ending Story of Peptide O-Xylosyltransferase. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* **61**, 794-809.
- Wilson IB, 2002. Functional Characterization of *Drosophila Melanogaster* Peptide O-Xylosyltransferase, the Key Enzyme for Proteoglycan Chain Initiation and Member of the Core

- 2/I N-Acetylglucosaminyltransferase Family. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 21207-21212.
- Wise GE, King GJ, 2008. Mechanisms of Tooth Eruption and Orthodontic Tooth Movement. *Journal of Dental Research* **87**, 414-434.
- Wolpert L, 1969. Positional Information and the Spatial Pattern of Cellular Differentiation. *Journal of Theoretical Biology* **25**, 1-47.
- Wu M, Chen G, Li YP, 2016. TGF- β and BMP Signaling in Osteoblast, Skeletal Development, and Bone Formation, Homeostasis and Disease. *Bone Research* **4**, 1-21.
- Wu Q, Wang M, Zuscik MJ, Chen D, O'Keefe RJ, Rosier RN, 2008. Regulation of Embryonic Endochondral Ossification by Smurf2. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society* **26**, 704-712.
- Wu S, Yang W, De Luca F, 2015. Insulin-Like Growth Factor-Independent Effects of Growth Hormone on Growth Plate Chondrogenesis and Longitudinal Bone Growth. *Endocrinology* **156**, 2541-2551.
- Wysolmerski JJ, 2012. Parathyroid Hormone-Related Protein: An Update. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **97**, 2947-2956.
- Xie Z, Khair M, Shaikat I, Netter P, Mainard D, Barré L, Ouzzine M, 2018. Non-canonical Wnt induces chondrocyte de-differentiation through Frizzled 6 and DVL-2/B-raf/CaMKII α /syndecan 4 axis. *Cell Death and Differentiation* **25**, 1442-1456.
- Xiong J, O'Brien CA, 2012. Osteocyte RANKL: New Insights into the Control of Bone Remodeling. *Journal of Bone and Mineral Research* **27**, 499-505.
- Yakar S, Rosen CJ, Beamer WG, Ackert-Bicknell CL, Wu Y, Liu JL, Ooi GT, Setser J, Frystyk J, Boisclair YR, LeRoith D, 2002. Circulating Levels of IGF-1 Directly Regulate Bone Growth and Density. *The Journal of Clinical Investigation* **110**, 771-781.
- Yamaguchi A, Sakamoto K, Minamizato T, Katsube K, Nakanishi S, 2008. Regulation of Osteoblast Differentiation Mediated by BMP, Notch, and CCN3/NOV. *Japanese Dental Science Review* **44**, 48-56.
- Yang J, Andre P, Ye L, Yang YZ, 2015. The Hedgehog Signalling Pathway in Bone Formation. *International Journal of Oral Science* **7**, 73-79.
- Yang L, Tsang KY, Tang HC, Chan D, Cheah KS, 2014. Hypertrophic Chondrocytes Can Become Osteoblasts and Osteocytes in Endochondral Bone Formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 12097-12102.
- Yang Y, Topol L, Lee H, Wu J, 2003. Wnt5a and Wnt5b Exhibit Distinct Activities in Coordinating Chondrocyte Proliferation and Differentiation. *Development* **130**, 1003-1015.
- Yavropoulou MP, Yovos JG, 2007. The Role of the Wnt Signaling Pathway in Osteoblast Commitment and Differentiation. *Hormones (Athens)* **6**, 279-294.

- Yoon BS, Pogue R, Ovchinnikov DA, Yoshii I, Mishina Y, Behringer RR, Lyons KM, 2006. BMPs Regulate Multiple Aspects of Growth-Plate Chondrogenesis through Opposing Actions on FGF Pathways. *Development* **133**, 4667-4678.
- Young EL, Wishnow R, Nigro MA, 2006. Expanding the Clinical Picture of Simpson-Golabi-Behmel Syndrome. *Pediatric Neurology* **34**, 139-142.
- Young MF, Bi Y, Ameye L, Chen XD, 2002. Biglycan Knockout Mice: New Models for Musculoskeletal Diseases. *Glycoconjugate Journal* **19**, 257-262.
- Yu B, Chang J, Liu Y, Li J, Kevork K, Al-Hezaimi K, Graves DT, Park NH, Wang CY, 2014. Wnt4 signaling prevents skeletal aging and inflammation by inhibiting nuclear factor- $\kappa\beta$. *National Medecin* **20**, 1009-1017.
- Zaia J, Liu B, Boynton R, Barry F, 2000. Structural Analysis of Cartilage Proteoglycans and Glycoproteins Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry* **277**, 94-103.
- Zhang C, 2010. Transcriptional Regulation of Bone Formation by the Osteoblast-Specific Transcription Factor *Osx*. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* **5**, 1-7.
- Zhang Z, 2015. Chondrons and the Pericellular Matrix of Chondrocytes. *Tissue Engineering. Part B, Reviews* **21**, 267-277.
- Zhao Z, Zhao M, Xiao G, Franceschi RT, 2005. Gene Transfer of the Runx2 Transcription Factor Enhances Osteogenic Activity of Bone Marrow Stromal Cells in Vitro and in Vivo. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* **12**, 247-253.
- Zheng J, Luo W, Tanzer ML, 1998. Aggrecan Synthesis and Secretion. A Paradigm for Molecular and Cellular Coordination of Multiglobular Protein Folding and Intracellular Trafficking. *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 12999-121006.
- Zhou N, Li Q, Lin X, Hu N, Liao JY, Lin LB, Zhao C, Hu ZM, Liang X, Xu W, Chen H, Huang W, 2016. BMP2 Induces Chondrogenic Differentiation, Osteogenic Differentiation and Endochondral Ossification in Stem Cells. *Cell and Tissue Research* **366**, 101-111.
- Zittermann SI, Capurro MI, Shi W, Filmus J, 2010. Soluble Glypican 3 Inhibits the Growth of Hepatocellular Carcinoma in Vitro and in Vivo. *International Journal of Cancer* **126**, 1291-1301.
- Zoch ML, Clemens TL, Riddle RC, 2016. New Insights into the Biology of Osteocalcin. *Bone* **82**, 42-49.

Article

Article en soumission

Accelerated chondrocyte maturation and bone remodeling through upregulation of TGF β and Wnt4 signaling are key features of a murine model of the skeletal defects caused by deficiency in *Xylt1*

Dima Ghannoum, Mahdia Taieb, Lydia Barré, Mohamed Ouzzine*

UMR 7365 CNRS-University of Lorraine, Biopôle, Faculty of Medicine, CS 50184, 54505, Vandoeuvre-Lès-Nancy, Cedex, France.

*Address for correspondence:

Dr Mohamed OUZZINE

Corresponding author: UMR7365 CNRS-University of Lorraine

Biopôle, Faculty of Medicine, CS 50184,

54505, Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

Phone: +33 383 685 427

E-mail: mohamed.ouzzine@univ-lorraine.fr

Abstract

Proteoglycans (PGs) are a group of complex macromolecules involved in many biological processes, including proliferation, cell-cell attachment and cartilage and bone homeostasis. Their proper function depends upon the glycosaminoglycans chains which are covalently attached to PG core proteins. Xylosyltransferase I (XT-I), is the enzyme catalyzing the first and rate limiting step in GAG chains synthesis. Genetic mutations in the *XylT1* gene are associated with Desbuquois dysplasia type II syndrome. The knock-out of *XylT1* gene in chondrocytes revealed numerous skeletal abnormalities. Histological studies and SHG microscopy (second harmonic generation) of the growth plate showed the importance of XT-I in extracellular matrix formation, fibrillation of collagen type II, maturation of chondrocytes and their columnar organization. Moreover, TRAP staining and histomorphometric analysis showed a stimulation of the osteoclasts activity in spongy bone leading to bone resorption, and increased ossification of the cortical bone. On the other hand, analysis of molecular mechanism indicates the implication of TGF- β and Wnts signaling pathway in skeletal defects and impaired chondrogenesis. In the present study we provided evidence of the key role of XT-I in extracellular matrix organization, and bone remodelling, and highlighted the role of the TGF- β pathway in developmental abnormalities induced by the loss of *XylT1*.

Key words: Xylosyltransferase I, proteoglycans, extracellular matrix, cartilage, bone formation, skeletal development

Introduction

Proteoglycans (PGs) are cell surface-associated and extracellular matrix (ECM) components that play a critical role in key biological process and in homeostasis of different tissues including cartilage and bone (1, 2). Owing to their ability to interact with soluble ligands, PGs regulate morphogen gradient formation, growth factor function and act as co-receptors for several ligands (3, 4). PGs consist of glycosaminoglycan (GAG) chains that attached on the specific serine residues of a core protein. Based on the type of GAG chain disaccharides units, PGs could be divided into two types, heparan-sulphate PGs (HSPG) and chondroitin/dermatan sulphate PGs (CS/DSPG) (5). Both type of PGs shares a common tetrasaccharide linker region consisting of GlcA- β 1,3-Gal- β 1,3-Gal- β 1,4-Xyl- β -O. The synthesis of the linkage tetrasaccharide involves the coordinate action of xylosyltransferases I and II (XT-I and XT-II), β 1,4-galactosyltransferase 7 (GalT-I), β 1,3-galactosyltransferase 6 (GalT-II) and β 1,3 glucuronyltransferase I (GlcAT-I) enzymes (6). The xylosyltransferases I and II (XT-I and XT-II, EC 2.4.2.26) catalyze the initial and rate-limiting step in GAG synthesis by transfer of xylose residue from the activated sugar UDP-D-xylose to specific serine residues in the PG core protein (7, 8). Besides their enzymatic function similarity, their expression differs between species where all higher organisms have two xylosyltransferase isoforms while only XT-I isoform is expressed in the fly and the worm (9).

Mutations in the genes encoding the enzymes involved in GAG biosynthesis pathway are associated with several syndromes and pathologies in human. It has been reported that mutations in *B4GALT-7* gene encoding GalT-I enzyme cause Ehlers-Danlos progeroid type 1 syndrome and Larsen of Reunion Island which are characterized by dwarfism, hyperlaxity and distinctive facial features (10, 11). Furthermore, mutations in *B3GALT-6* gene encoding GalT-II enzyme are associated with the Ehlers-Danlos progeroid type 2 syndrome and Spondylo-epimetaphyseal dysplasia with joint laxity type 1 (12). These syndromes are characterized by facial appearance, clubfeet, elbow malformation and kyphoscoliosis. Moreover, it has been reported that mutations in *B3GAT3* gene encoding GlcAT-I enzyme cause Larsen-like syndrome, characterized by multiple joint dislocations, short stature, craniofacial dimorphism and congenital heart defects (13).

Recently, several cases of patients with Desbuquois dysplasia type II (DBQD2) have been attributed to mutation in *XYLT1* (5, 14 – 18). This syndrome is characterized by sever prenatal and

postnatal shortening of long bones, short stature and joint dislocation, and it frequently features developmental delay or intellectual disability (19). In a forward genetic screen of skeletal tissues in developing zebrafish larvae, Eames et al. (2011) isolated mutants with increased chondral bone and decreased cartilage matrix and identified mutations in *FAM20b* and *XylT1* genes. Further analyses showed that mutations in *Fam20b* and *XylT1* in zebrafish decreased cartilage matrix production and accelerated the timing of chondrocyte maturation and *Ihh* expression (20). In addition, *Mis et al.* (2014) isolated a recessive dwarf mouse mutant (pug) from an N-ethyl-N-nitrosourea mutagenesis screen and identified a missense mutation in the *XylT1* gene in pug mutant. They showed that the pug mutant exhibits reduced XT-I enzyme activity, increased *Ihh* expression and premature chondrocyte maturation (21). These studies indicate that XT-I plays a key role in chondrocyte maturation and skeletal development, however the molecular mechanism involved is not clearly elucidated.

In order to investigate the role of xylosyltransferase I in chondrocyte maturation and skeleton development, and identifying the molecular mechanism involved, we generated a chondrocyte-stage-specific XT-I deficient mice *Col2a1-CreERTM; XylT1^{fllox/fllox}* with inducible deletion of *XylT1* specifically in chondrocytes. Ablation of XT-I in chondrocytes lead to dwarfism phenotype with shortened long bones. Histochemical analyses revealed defects in the growth plate with decreased PG content, loss of columnar organization of chondrocytes. SHG microscopy revealed defects in extracellular matrix formation and fibrillation of collagen. Structural analyses of bone showed decreased trabecular bone number and increased cortical bone. Analysis of the molecular mechanisms involved indicates upregulation of TGF β 2 and Wnts and enhanced osteoclast activity in the growth plate of XT-I cKO mice. Studies on osteoblasts showed enhanced expression of bone matrix components in XT-I cKO mice.

Results

XylT1 deletion in chondrocytes causes dwarfism with reduced bone length

To bypass of embryonic lethal phenotype of global XT-I deletion, given that the *XylT1* knockout mice died immediately after birth, conditional *knockout* approach was used to study the function of XT-I in cartilage. To determine the specific role of *XylT1* in cartilage, *XylT1^{fllox/fllox}* mice with *XylT1* exon 5 flanked with two *LoxP* sites were generated (**Figure 1**) and crossed with *Col2 α 1-CreERTM* carrying tamoxifen (TM)-inducible Col2 α 1-promoter driven Cre recombinase to generate *Col2 α 1-CreERTM;XylT1^{fllox/fllox}*. *XylT1-cKO* mice carrying *XylT1* ablation in chondrocytes, were generated by tamoxifen administration and induction of Cre recombination *in vivo* in *Col2 α 1-CreERTM;XylT1^{fllox/fllox}* mice. Age- and sex-matched *Col2 α 1-CreERTM;XylT1^{fllox/fllox}* mice were separated in two groups and injected at weeks 3, 5 and 7 postnatal either with corn oil (control) or tamoxifen (TM). Mice were then euthanized at 8 weeks for skeletal development evaluation. By 8 weeks *XylT1-cKO* mice were significantly smaller (20%) compared to control mice (**Figure 2 A-C**). Measurement of the length of long bones showed reduction of about 25% and 30% in the length of femurs and tibia, respectively (**Figure 2 D-F**). Other features of the skeletal phenotype in *XylT1-cKO* mice included shortening limbs with more pronounced shortening in forelimb elements, smaller ribcage, broadening of the ribs, early trachea ossification, shortening of the skull, reduced length tail, defects in cartilaginous content and reduced disc cartilage that separate the spine bones (**Figure 3**). Taken together, these data suggest that functional *XylT1* is crucial for cartilage development and endochondral bone formation.

Loss of XylT1 induces structural bone defects

The persistence of shortening limb and body length after 3 months age demonstrate that *XylT1-cKO* mice phenotype cannot be due to a delay in skeletal development. To better emphasize bone defects, Micro Computer Tomography (μ CT) was performed. Analysis by μ CT of femurs of *XylT1-cKO* mice reveals decrease in the number of trabecular bone (Tb.N.) (**Figure 4 A'', B''**), while their thickness was significantly increased (Tb.Th.) (**Figure 4 A, A', B, B'**), compared to control mice, suggesting increase bone resorption and/or impaired bone formation *XylT1-cKO*

mice. In contrast, μ CT showed an increasing of cortical bone thickness in *XylT1-cKO* mice compared to control (**Figure 4 A''', B'''**), suggesting increase secretory activity of osteoblasts or impaired resorption. Of note, bone mineral density (BMD) was reduced in *XylT1-cKO* mice (**Table 1**). However, no remarkable changes in bone volume, trabecular separation, trabecular pattern factor, and structure model index were detected (**Figure 4 C**). In addition, *XylT1-cKO* mice exhibit wider femoral epiphysis and more developed femoral head than that of control mice (**Figure 4 D and E**). Altogether, these data indicate that loss of *XylT1* results in bone defects associated with changes in endochondral ossification and periosteal bone formation, suggesting a critical role of XylT1 in bone homeostasis.

The cartilage growth plate is disorganized and deficient in proteoglycans in XylT1 mutant mice

Having demonstrated the importance of *XylT1* in cartilage and bone development, we sought to explore the cellular mechanism by which *XylT1* regulates skeletogenesis. Knee joints from control and TM-treated 10-days old *XylT1-cKO* mice were examined histologically. Haematoxylin eosin and Safran (HES) staining of the tibia growth plates from control mice showed that control mice exhibit a well-organized growth plate in which the resting, proliferative and hypertrophic zones were clearly distinguishable (**Figure 5 A**). In addition, the cells in the proliferative zone were closely aligned in well-ordered columns (**Figure 5**). However, *XylT1-cKO* mice developed a growth plate in which the proliferative zone had a disordered cellular organization and morphology (**Figure 5 C**), including increased cell size. Indeed, chondrocytes are of larger size, stacked, not fattened and seems not to rotate around each other upon cell division. Of note, the hypertrophic zone was severely reduced, suggesting accelerated maturation of chondrocytes and subsequent acceleration of ossification (**Figure 5 D**). Furthermore, the growth plate from control mice stained strongly positive for proteoglycans, whereas in *XylT1-cKO* mice the staining was profoundly reduced overall the growth plate and nearly absent at the pericellular matrix, reflecting a decrease in the synthesis of proteoglycans in the growth plate of mutant mice (**Figure 5 C**). To determine whether defects observed in the growth plate at 10-days of age persist at advanced ages, histological analysis of the growth plate of tibia of control mice and TM-treated 4-weeks old *XylT1-cKO* was performed. The data showed profound disruption of the columnar organization of proliferative chondrocytes in *XylT1-cKO* mice, a structure which is essential for

proper linear growth of endochondral bones. Indeed, proliferative chondrocytes forms cell clusters rather than organized column, as is the case in control mice (**Figure 6 B and C**). Furthermore, Alcian bleu staining indicates high amount of GAG-attached proteoglycans in the pericellular matrix of chondrocytes in control mice but only small amount of these macromolecules was detected in the pericellular matrix of XylT1-cKO mice chondrocytes (**Figure 6 A**), indicating impaired synthesis of proteoglycans. Of note, similar results including loss of columnar organization of proliferative chondrocytes and impaired synthesis of proteoglycans are observed in the growth plate of TM-treated 8-week-old XylT1-cKO compared to age matched control mice (**Figure 7**). Altogether, these results suggest that XylT1 plays a key role in the synthesis of GAG-attached proteoglycans and regulation chondrocyte maturation and organization in the growth plate.

The cartilage growth plate exhibits disturbance in collagen organization in XylT1 mutant mice

The growth plate ECM plays a crucial role in the arrangement and geometry of chondrocytes, the morphology of the growth plate and the elongation of bones. It is mainly composed of collagens and proteoglycans. The ECM located between the columns of chondrocytes (interterritorial) contains collagen fibrils that largely run parallel to each other and suggested to play a role in guiding the chondrocytes to arrange in a columnar structure (22). To assess the organization of collagen in the growth plate of XylT1-cKO mice, SHG (Second Harmonic Generation) microscopy was used. The data revealed clear differences in the orientation of collagen fibres between growth plate of control and XylT1-cKO mice (**Figure 8**). While the collagen fibrils run parallel to each other in control mice, they appear more abundant and randomly oriented in XylT1-cKO mice (**Figure 8**), suggesting profound alteration in the organisation of intercolumnar collagen fibrils. These data support the notion that lack of XylT1 lead to disturbance of collagen organization in the growth plate.

XylT1 deficient mice exhibit accelerated maturation of chondrocytes and enhanced bone formation

To determine whether maturation was proceeding normally in XylT1-cKO mice, we examined several markers of chondrocyte maturation by mRNA *in situ* hybridization using RNAscope technique. We first evaluated the expression of chondrogenesis markers, Aggrecan, Collagen II and Collagen 10. The mRNA encoding aggrecan core protein showed an increased expression in XylT1-cKO mice compared to control (**Figure 9 A**), suggesting that chondrocytes, probably in an attempt to compensate the loss of GAG-attached aggrecan, they increase the expression of the aggrecan core protein. Col2a1, the cartilage specific form of type II collagen is upregulated in XylT1-cKO mice compared to control and this may result from disorganization of the collagen network in the growth plate of mutant mice (**Figure 9 A**). Interestingly, the expression of Collagen 10 (Col X), a marker for hypertrophic chondrocytes, was highly expressed (**Figure 9 A**). Of note, the hypertrophic region indicated by Col X expression is noticeably reduced compared to that of control mice, thus confirming reduced hypertrophic zone in mutant mice. This may result from a higher percentage of cells exiting the hypertrophic state, suggesting accelerated terminal differentiation of chondrocytes and enhanced cartilage resorption. Interestingly, osteopontin, which is expressed in terminally differentiated hypertrophic chondrocytes and in osteoblasts, is highly expressed in XylT1-cKO mice (**Figure 9 B**), suggesting enhanced terminal differentiation of hypertrophic chondrocytes. As observed for osteopontin, the expression of osteocalcin was higher in XylT1-cKO mice (**Figure 9 B**). High expression of these bone markers, osteopontin and osteocalcin suggests elevated bone formation in XylT1-cKO mice (**Figure 4**) as it was pointed out above by microCT analysis. Altogether these results suggest that loss of XylT-1 expression in chondrocytes not only affect chondrogenesis but also bone formation by enhancing endochondral ossification.

The expression of Ihh, Wnt4 and TGF β RII are upregulated in the growth plate of XylT1 deficient mice

Signaling pathways such as TGF β , Ihh and Wnts have been shown to be involved in chondrocyte maturation and growth plate development (23, 24, 25, 26). To explore the mechanism by which loss of XylT1 may affect chondrogenesis and bone formation, we analyzed whether the

expression of *Ihh*, TGF β and Wnts that play key role in the regulation of chondrocyte maturation and skeletal development is altered in cKO mice. Analysis of the expression of *Ihh* in the growth plate of XylT1-cKO and WT mice clearly shows enhanced expression, however the prehypertrophic domain marked by *Ihh* is reduced in XylT1-cKO compared to control mice (**Figure 10 A**). Thus, confirming the shortening of the prehypertrophic zone in XylT1-cKO mice. It has been reported that Wnt-4 accelerates chondrocyte maturation and overexpression of Wnt-4 in the growth plate during chondrogenesis leads to dwarfism in mice (26, 27). Analysis of the expression of Wnt-4 showed expression mainly in prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes in the growth plate of WT mice, however in XylT1-cKO mice Wnt-4 is expressed in proliferative and columnar chondrocytes in addition to prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes (**Figure 10 B**), indicating misexpression of Wnt-4 in mutant mice. Of note, chondrocyte proliferation as measured by phospho-Histone H3 labeling revealed decreased number of proliferating cells in the proliferative and columnar zones of the mutant, when compared with WT growth plate, indicating that chondrocytes exit cell cycle precociously and that loss of XylT1 impairs chondrocyte proliferation and maturation (**Figure 11**).

We showed above that the expression ECM components, aggrecan and type II collagen, are upregulated in XylT1-cKO growth plate. Given that TGF β signaling pathway is a potent inducer of the expression of both aggrecan and collagen in the growth plate, we hypothesized that TGF β signaling may be affected in XylT1-cKO mice. Interestingly, we found that TGF β RII, a TGF receptor that binds TGF β and mediates signaling, is strongly expressed in the growth plate of XylT1-cKO mice compared to control mice (**Figure 12 A**). In both XylT1-cKO and WT mice, the receptor is mainly expressed in proliferative and hypertrophic zone of the growth plate, however its expression is higher in XylT1-cKO mice compared to WT (**Figure 12 A**). As TGF β signal downstream through Smad2/3, we examined the phosphorylation status of Smad2 in the growth plate of mutant and WT mice, using phospho-Smad2 antibodies. Immunohistochemistry analysis shows some phospho-Smad2 positive cells in proliferative and columnar chondrocytes in the growth plate of WT mice. In stark contrast, we observed upregulation and higher percentage of positive phospho-Smad2 cells in proliferative and columnar chondrocytes of mutant mice (**Figure 12 B**).

To determine whether increased signaling of TGF β in mutant mice is involved in the development of dwarfism phenotype, we examined the effect of inhibition of TGF β signaling on body length of mutant mice. To this end, mice were separated in 3 groups; G1 (WT), G2 (cKO mice) and G3 (cKO injected with TGF β R1 inhibitor) (**Figure 13 A**). Comparison between G2 and G3 showed a rescue of the body length of mice XylT1-cKO injected with TGF β R1 inhibitor. The body length of these mice was increased by about 6% compared to XylT1-cKO littermate (**Figure 13 B**). Based on these results and previous study, we can suggest that loss of XT-I expression impairs TGF β signaling and disturbs chondrogenesis and ossification during skeletal development.

XylT1 deficient mice display increased osteoclast activity

TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) staining was used as an osteoclast-specific marker. The analysis of TRAP staining revealed TRAP-positive cells at several bone areas, the chondro-osseous junction, trabecular bone and cortical bone of cKO mice. Interestingly, all these areas showed an increase TRAP-positive cells in XylT1 deficient mice (**Figure 14 A**). Counting the number of TRAP-positive cells per surface (N.O/B.S) reveals two fold TRAP-positive cells in cKO mice compared to WT mice (**Figure 14 B**). These results suggest that XylT1 deficient mice have an increase osteoclast numbers and that the deletion of XT-I may result in impaired bone remodeling and modeling.

Effect of XylT1 deficiency on osteoblast activity

The XT-1 deficiency following a conditional invalidation by injection with tamoxifen had repercussions not only on the maturation of the chondrocytes but also on the process of endochondral ossification in the mutated mice. Thus, we showed an acceleration of endochondral ossification, an important activity of osteoblasts and a thick cortical and trabecular bone in cKO mice, thus suggesting a significant deposition of the bone matrix especially collagen type I (Col1), the most abundant organic matrix component. This forms a dynamic and instructive model for the deposition of calcium phosphate polymorphs and their subsequent transformation in hydroxyapatite crystals. In addition, recent studies have shown that chondrocytes have the ability to differentiate into osteoblasts. All these data suggest that XT-I deficiency in chondrocytes has

effects on osteoblast activity. For this, we studied the expression of some components of the bone ECM; Col1, Spp1 (OPN), DMP1 (Protein Matrix Protein 1) and MEPE (Extracellular Matrix Phosphoglycoprotein) and the expression of osterix (Osx, Transcription Factor). This study showed overexpression of type I collagen and osteopontin. DMP1 and MEPE are known to inhibit the formation of hydroxyapatite crystals in the bone matrix (28). The results showed overexpression of Col1, OPN and osterix, whereas the expression of DMP1 and MEPE was decreased in the mutated mice (**Figure 15**). These results suggest that chondrocyte XT-I deficiency is admitted as an effect on osteoblast activity and may affect biomineralization.

Discussion

The results presented in this article provide data regarding the function of xylosyltransferase I (XylT1), member of the PG synthesis pathway, in skeletal development in mice model. Xylosyltransferase I have been known for more than 40 years to catalyze the first step of GAGs synthesis, by transferring xylose from UDP-D-xylose to serine residues of PG core protein. It was found that XT-I is an important factor that regulate several aspects related to skeletal development. For instance, it was demonstrated that XT-I regulate cartilage degeneration during OA development and progression. In addition, it was shown that mutations in XylT1 gene are associated to Desbuquois dysplasia type II (DBQD2) syndrome. Added to that, XT-I is considered as a crucial regulator of PGs processing during chondrogenesis. In vitro studies have shown that XT-I expression increased during chondrogenic differentiation, as well as in vivo studies shed light on the putative role of XT-I in chondrocyte maturation and skeletal development during embryonic mice development.

Specifically, our work has demonstrated the importance of XylT1 in various aspects of skeletal development and endochondral ossification. Mice that express the Cre recombinase fused to a mutagenic oestrogen receptor, under the control of Col2 α 1 promoter were crossed to mice in which exon 5 of XylT1 was flanked with two loxP sites, resulting in conditional deletion of XylT1 in cartilage. Appendicular and axial skeleton were compared in Col2 α 1-CreERTM;XylT1^{lox/lox} injected with corn oil as control group and Col2 α 1-CreERTM;XylT1^{lox/lox} injected with tamoxifen as experimental group.

XT-I is essential in skeletal element development and normal tracheal structure

Eames et al. revealed that mutations in XT-I and fam20b, members of PGs synthesis pathways, are associated to CSPGs loss and acceleration of endochondral ossification in Zebrafish model (20). In the other hand, Mis et al. reported a mutation in XylT1 in pug mice which lead to decrease XT-I activity and disruption of subcellular localization. These mice displayed dwarfism, impaired chondrogenesis and bone defects (21). In our study, we show that loss of XT-I in cartilage in postnatal cKO mice strongly affects skeleton system. Accordingly, skeletal examination by Alcian blue and Alizarin red staining demonstrated multiple defects in axial skeleton comprising the skull, the rib cages, the spine disc and the tail in knockout mice compared to littermate wild-

type. In addition, defects included a reduction in length of long bones which constitute the appendicular skeleton. All these skeletal elements, excepting skull bones, are formed through endochondral ossification, where cartilage serves as a template to be completely replaced by new bone. These results are compatible with those demonstrated in *pug* mice. Concerning skull bones comprising parietal and frontal bones formed by intramembranous ossification and occipital bone formed by endochondral ossification, they show reduction in their size in cKO mice. Knowing that invalidation of *XylT1* in our mice model is specific in cartilage tissue, it was surprising that skull was affected. We know that *Col2a1* is expressed in interparietal bone (29) and occipital bone suggest that size reduction of parietal and frontal bones may due to defect in other bones formed by endochondral ossification. Cartilage is not restricted to these skeletal elements, but it is found in tracheal which is known as cartilaginous tube. In 1991, Roberts and Paré were demonstrated that changes in PG structures, as well their distribution in trachea may contribute to biomechanics changes in cartilage (30). In addition, Reinhardt et al. showed that collagen and PGs deposition increased in sub-epithelial extracellular matrix in airway remodeling mice model which is similar to asthma pathology (31). These finding revealed the importance of PGs in respiratory system. For the first time, we have detected a defect in trachea where the cartilage was ossified in knockout mice suggesting a tracheal respiratory problem related to XT-I deficiency.

XylT1 is crucial for normal chondrocytes maturation, extracellular matrix organization and collagen fibrillation

Cartilage is particularly rich in extracellular matrix, representing 90% of the dry weight of the tissue, secreted by chondrocytes. This matrix consists mainly of water (65-80%), collagen (15-22%), proteoglycans (4-7%), hyaluronic acid and a smaller amount of non-collagenic proteins and lipids. Collagen type II and aggrecan are the major components of the dry weight of cartilage. Proteoglycans play critical roles in endochondral ossification and chondrocytes differentiation. Their proper function depends on glycosaminoglycan chains covalently attached to a serine residue in PG core proteins. Disturbances in functional GAG chains synthesis lead to several cartilage and bone disorders. Mutations in chondroitin synthase lead to short stature and limb malformation. In addition, mutations in Solute carrier family 26-member A2 (SLC26A2) cause lethal chondrodysplasia with severe under-development of skeleton (32). Mutations in xylosyltransferase I that catalyzes the first step of GAG chains synthesis are associated to Desbuquois dysolplasia

type II, and less activity of XT-I leads to premature chondrocyte maturation and has effects on the endochondral skeleton. Our work demonstrates that loss of XT-I in cartilage leads to reduction in pericellular and interterritorial GAG synthesis in growth plate extracellular matrix with early chondrocyte maturation reflected by decrease in hypertrophic zone thickness and the overexpression of Col10. Study of aggrecan level shows an overexpression in the growth plate of cKO mice which may indicate that loss of GAG synthesis is compensated by increasing aggrecan core protein expression.

The ECM provides structural strength to tissues, maintaining a normal architecture around the cells and the shape of tissues. Previous studies have reported PGs involvement in the structure of cartilage matrix. Thus, it has been shown that functional defects of SLC26A2 may result in a reduction of the intracellular sulfate pool, leading to the synthesis and secretion of sub-sulfated PGs (33). This leads to an alteration of the architecture and mechanical properties of the ECM (34). In addition, mice deficient in N-acetyl-galactosaminyltransferase chondroitin sulfate (CSGalNAcT-1) show significant dwarfism and exhibit disorganized growth plate and reduction of ECM primarily in the proliferative zone (35). In 2014, studies conducted by Lauing et al. on a mouse model with aggrecan deficiency in cartilage showed that this PG regulates chondrocyte survival, morphological transition, columnar cell organization and gene expression at the growth plate level. Our study shows disruption of columnar organization of growth plate chondrocyte. Added to that, we reveal disruption of chondrocytes morphology which are round and closer to each other due to a defect in ECM components, especially collagen type II and aggrecan.

Collagen fibers are essential in ECM structure, and interaction between collagen and proteoglycans is well known in connective tissue. Indeed, it was shown that aggrecan protect collagen fibers from proteolytic cleavage. In addition, loss of decorin as in the case of deficient mice leads to thin collagen fibers, but in the presence of this molecule without its GAG chain leads to thicker collagen fibers. Added to that, studies carried out on mice deficient in collagen II, show that these mice develop a lethal chondrodysplasia characterized by an abnormal bone morphology resulting from a complete absence of endochondral ossification and the lack of intervertebral disc formation (36). Our analyses of collagen type II expression and distribution in growth plate demonstrate an overexpression, a heterogeneous distribution, packed and thicker collagen fibers which may lead to disruption of chondrocyte morphology in cKO mice.

Normal cartilage formation is essential for normal bone morphometry and homeostasis

Long bones are formed through endochondral ossification process which requires chondrocytes epiphyseal growth plate for normal bone elongation. Epiphyseal growth plate results from chondrocyte proliferation and differentiation, and it was shown that defects in growth plate had harmful effects on bone strength and form during growth. During this process, chondrocytes secrete factors that are required for osteoblast differentiation and maturation. In addition, several studies had shown that hypertrophic chondrocytes may differentiate into osteoblasts to form bones, they are essential for trabecular formation and they have the capacity to transform into bone cells in fracture callus (37–39). All these data confirm the crucial role of growth plate cartilage in normal bone development. Our histological analyzes of growth plate demonstrate chondrocyte defects suggesting that may we have bone morphometry abnormalities. Microtomography of femur bones shows decrease in trabecular number which may be due to the defects in hypertrophic cells. In addition, we show that the thickness of trabecular and cortical bones increased in cKO mice. Increasing cortical bone is compatible with TMD increasing. In contrast, we show a decrease in BMD value suggesting a possibility to develop osteoporosis. Analyzing of osteoblasts and osteoclast activity by in situ hybridization and TRAP staining in bones reveals high activity of these two cell types, suggesting an important bone remodeling in mutant mice.

Proper endochondral ossification is regulated by TGF- β and Wnts signaling pathways

Endochondral ossification is regulated by a wide range of hormones and growth factors which control cell differentiation, cell migration, cell proliferation, apoptosis, and tissue remodeling. TGF- β and Wnts families are known to play critical roles in chondrogenesis and bone formation. Biological effects of TGF- β are mediated by T β RI, T β RII and T β RIII (a proteoglycan) receptors. This family plays a critical role in bone remodeling and chondrogenesis by stimulate bone matrix synthesis and by stimulate Col2 and aggrecan expression. A study realized on ES cell gene-trap screen for target genes of BMP signaling showed that chondroitin-4-sulfotransferase (*C4st1*)-deficient mice have a severe chondrodysplasia that is characterized by global reduction in chondroitin sulfate (CS) content in the growth plate and by increased TGF- β signaling (40). In addition, the study of transgenic mice overexpressing a truncated form of dominant-negative T β RII in the epiphyseal growth plate shows overexpression of certain chondrogenic maturation markers such as ColX and *Ihh* (41). TGF- β is known to prevent chondrocytes from differentiating further

into proliferative cells and inhibits pre-hypertrophic and hypertrophic differentiation. In our cKO model, we show overexpression of Col2 and aggrecan as well as defects in hypertrophic zone, one prediction would be that TGF- β signaling pathway is perturbed. Indeed, we observed an overexpression of T β RII receptor in cKO growth plate which indicate a disruption in TGF- β signaling pathway that may due to default in ECM components essential for growth factors regulation or due a default in T β RIII, a betaglycan that serves as coreceptor in TGF- β signaling. In addition, we made the novel observation that LY364947, T β RI inhibitor, may present an effective therapeutic for dwarfism observed in cKO mice.

In the other hand, it was shown that Wnts family play a crucial role in endochondral ossification. Indeed, it was demonstrated that Wnt4 blocks the initiation of chondrogenesis, but it accelerates the terminal differentiation of chondrocytes *in vitro*. It has also been shown that overexpression of Wnt4 induces chondrocyte proliferation, altered maturation, decreased VEGF expression and led to dwarfism. Also, Wnt5b acts on chondrogenesis. In contrast to Wnt4, Wnt5b promotes the transition from resting chondrocytes to proliferative chondrocytes and inhibits terminal chondrocyte differentiation *in vivo*. Wnts family signaling is regulated by HSPGs such as syndecans. Knowing that our cKO mice have reduction in their GAG chains, we predict that Wnt signaling pathway would be disrupted. In our study, we demonstrate an overexpression of Wnt4 in cKO growth plate especially in resting and proliferative zones which is related to thicker proliferative zone showed in cKO mice. Despite the overexpression of these two factors that promote proliferation and inhibit the differentiation of chondrocytes, there was an acceleration of hypertrophy that could be caused by other signaling pathways as FGFR3 which promote differentiation of chondrocytes.

XT-I is essential for osteoblast activity

XT-I deficiency has remarkable effects on chondrogenesis and chondrocyte maturation, as well as on the process of ossification. Our histological study of long bones and their constituent cells shows significant activity of osteoblasts and osteoclasts as well as thickening of trabecular and cortical bones, suggesting an increased material deposit.

We have analyzed the expression of type I collagen in osteoblasts derived from the long bones of mutated and wild mice. These cells play an active role in the synthesis of type I collagen and calcification of bone matrix. Type I collagen and other fibrillar collagens are synthesized as

precursors, procollagens which are rapidly cleaved by specific proteases, ADAMTS 2 and BMP1, so that shorter molecules assemble to form fibrils (42). Thus, the collagen fibers formed are associated with non-collagenous proteins secreted by osteoblasts such as the SIBLING (Small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein) family, plasma proteins and growth factors. This newly formed matrix, called osteoid tissue will be mineralized in a second time to form the inorganic matrix. The orientation and thickness of the collagen lamellae as well as the inorganic components provide the specific architecture of the cortical bone. This lamellar architecture ensures the biomechanical stability and tensile strength of a compact bone (43). In XT-I deficient mice we have shown high expression of type I collagen. It will be important to study the expression, organization and structure of these fibers in the bone tissues of mutated and wild mice. and to examine the susceptibility to fractures.

Non-collagenous proteins constitute 10% of the organic tissue of the bone and 2% of the total weight of the bone. They can be classified into several groups, including the SIBLING family, which is expressed in bones and / or teeth (44). However, this expression is not limited to mineralized tissue but extends to a variety of cells, tissues and body fluids (45). This family includes several proteins including OPN, DMP, MEPE and BSP. The OPN has many biological functions. Indeed, it is an important regulator of bone remodeling and mineral crystallinity and is associated with pathological events such as inflammation and tissue calcification (46). It is important to note that the regulatory role of OPN in normal and pathological mineralization is highly dependent on the phosphorylation state of the protein. Moreover, its deficiency in a *knockout* mouse model shows an increase in mineral content and hydroxyapatite crystals as well as an impairment of osteoclast function (47, 48). In addition, DMP1 and MEPE are known to inhibit biomineralization in bone tissue (28). Indeed, it has been shown that MEPE deficiency results in an increase in bone density and trabecular bone thickness (49) . The study of these three proteins (OPN, DMP1 and MEPE) shows an overexpression of OPN, unlike DMP1 and MEPE whose expression is decreased, indicating an increased activity of osteoblasts and a possibility of an increase in biomineralization. These results need to be confirmed by several approaches such as the analysis of Van Kossa staining mineralization on undecalcified histological sections, the analysis of the in vitro mineralization process, the analysis of the phosphorylation state of OPN, analysis of alkaline phosphatase expression, involved in the mineralization process.

The regulation of bone formation is initiated by the transcription factors, Runx2 and Osx. Runx2 is an important factor in the stimulation of hypertrophy and in the control of chondrocyte proliferation by regulating the expression level of Ihh, and its expression is regulated by PTHrP during endochondral ossification (50). In addition, *knockout* mice for the Runx2 gene at the chondrocyte level show a complete loss of endochondral ossification (50). Runx2 promotes the expression of osterix (Osx) which in turn regulates the synthesis of the constituents of the ECM and its mineralization. Osx knockout mice show a complete lack of bone formation (51). We analyzed Osx expression in osteoblasts and showed overexpression in XT-I deficient mice. In view of this increase we can suggest an important synthesis of bone matrix components mainly type I collagen and OPN as well as increased activity of osteoblasts in mutated mice.

Materials and methods

Mouse strains and generation of Col2a1-CreERTM;XylTI^{fllox/fllox} mice

To generate the *Col2a1-CreERTM;XylTI^{fllox/fllox}* mice, male transgenics *Col2a1-CreERTM* (BALB/c background) were crossed to females *XylTI^{fllox/fllox}* (C75BL/6 background). These two transgenic mice were imported from “Institut Clinique De La Souris” Strasbourg, France. Offspring were genotyped by PCR for *Col2a1-CreERTM* and *XylTI^{fllox/fllox}* using specific primers described in table 1. Briefly, genomic DNA was extracted from tail biopsy by Lysis reagent for genotyping using Crude lysates (VIAGEN Biotech, Los Angelous) containing proteinase K (Sigma, France) for overnight at 55°C, then amplified by PCR using the HotStarTaq Plus PCR Master Mix Kit (Qiagen). The PCR cycling parameters were 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing 55°C for *Cre* and 62°C for *XylTI* for 30 seconds, and elongation for 90 seconds at 72°C. **LF**(5'- ATC CCT AAG ATG TGT TTT CCA GTC ACC AT -3'), **LR** (5'- GAG TTA GTT AAC CAG TGG GCT TGA GGT G -3'), **EF** (5'- CTA GAG ATG ACT GAC TGG CCC TGG GA -3'), **ER** (5'- TTT CCA AGG CAG CAC CTC TAG TTC A -3') and **LXR** (5'- CGA AGT TAT CTG CAG GTC GAC CTT AAG -3').

Animal Handling

The animal experiments were conducted according to the recommendations of European Directive 2010/63/UE and French legislation article R.214-88. The study was approved by the local ethical and animal care Committee (CEMLEA Comité éthique en Matière d'Expérimentation Animale). During acclimatization and experiments, the animals were kept in standard conditions of temperature (23 ± 2°C) and light-controlled environment (12 h light/12 h dark cycle), and with free access to water and pelleted food.

Tamoxifen (TM) administration

Tamoxifen (TM) was dissolved in 100% ethanol to prepare stock solution of 100 mg/ml by shaking for three hours at 55°C and stored at -20°C until used. Before injected to mice, the TM stock solution was diluted in corn oil (Sigma) to appropriate concentrations and protected from light. TM was injected intraperitoneally at 100 µg/g body weight for one-week-old or 60 µg/g for two-days-old mice. Mice were taken at three different ages; 10 days, 4 weeks and 8 weeks. Mice injection depend on their age. Mice were injected at first and third week of age with tamoxifen or

corn oil vehicle, then they were euthanized at 4-week-old. Mice were injected at first week of age followed by three injections at three, five and seven-week-old, then they were euthanized at 8-week-old. Concerning the mice euthanized at 10-day-old, they were injected at 2 days of age daily for 5 days with tamoxifen or corn oil. Mice injected with corn oil represent the control group (WT), however, mice injected with tamoxifen solution represent the group of *knockout* mice (cKO).

Morphometry assessment

During all the period of experiment as well as after injection with TM or corn oil (Control) the mice weight and growth was regularly measured. The length of femur and tibia at 8-week-old of wild-type and deficient mice was done. To do this, mice were tattooed 7 days after birth, then the body weight was measured with an appropriate balance. The length of hall skeleton, femurs and tibias was done by using digital electronic caliper.

Skeletal staining

For the whole skeletal staining, 4-week-old mice skeletons were freed from adherent tissue, fixed in 95% ethanol and stained for cartilage with Alcian Blue and counterstained for bone with Alizarin Red. Briefly, mice were skinned, eviscerated and stained by Alcian Blue solution (0,015%, 80% ethanol and 20% acetic acid, Sigma-Aldrich) for one day, followed by washing in several changes of 1% potassium hydroxide solution over several days. Following counterstaining with Alizarin Red (0,01% in 1% KOH, Sigma-Aldrich), mice tissue was cleared in glycerol/ethanol solution (80/20) and preserved at 100% glycerol.

High-Resolution Micro Computer Tomography assessment (μ CT)

The 8-weeks-old mice were euthanized, and the femurs were isolated, stripped of soft tissue, fixed in 4% formalin and stored in 70% ethanol. The bones were scanned using SKYSCAN 1272 High-Resolution X-Ray Microtomograph (Bruker microCT). Data were acquired with at 70 KV with 7 μ m cubic resolution. Three-dimensional reconstructions were generated with Microscan 1272 Bruker. The reconstruction, analysis and realistic visualization was done with NRECON software, with the following parameters: Smoothing: 0; Ring Artifact Correction: 2; Beam Hardening Correction: 35%; Minimum (Absorption coefficient): 0; Maximum (Absorption coefficient): 0.14. Both 2- and 3-D μ CT data included bone volume to total volume fraction (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular number (Tb.N), trabecular separation (Tb.Sp),

trabecular pattern factor (Tb.Pf), Ep cortical thickness (CT.Th), bone density, tissue mineral density (TMD), trabecular bone density (BMD), and structure model index (SMI) were quantified. These analyses were performed by RMES - "Regenerative Medicine and Skeleton" "UFR d'Odontologie de Nantes" Nantes, France.

Histological analysis and staining

Mice were euthanized at mentioned age to take the knee joints and bones specimens, fixed in 4% formalin for 24h at RT, decalcified in 10% EDTA (pH 7.6, Sigma-Aldrich) solution prepared in PBS at 4°C for around three weeks depending on the age of mice, dehydrated in Leica ASP 300S (Leica, Germany) tissue processor with programmed following steps formalin 1 for 30 minutes, formalin 2 for 30 minutes, ethanol 70% for 1 hour, ethanol 80% for 1.5 hours, ethanol 96% for 1.5 hours, ethanol absolute for 1 hour, ethanol absolute for 1.5 hours, ethanol absolute for 1.5 hours, xylene 1 for 1.5 hours, xylene 2 for 1.5 hours, paraffin 1 for 1 hour, paraffin 2 for 2 hours, paraffin 3 for 3 hours and embedded in paraffin. The sample was embedded in paraffin, and sections 5 µm thick were obtained from the specimen with manually Leica Leica RM 213 microtome (Leica, Germany). The sections were used either for staining or immunohistochemistry. The sections were stained with either Tartrate staining (Leukocyte Acid (TRAP) kit, Sigma-Aldrich), 0.001% Alcian Blue/0.001% kernechtrot staining, 0.1% Safranin-O/0.03% Fast Green staining, Harrys's hematoxyline/0.01% Eosine/0.01% Safran staining or 0.1 % Red Sirius in a SAKURA Autostainer (SAKURA). Staining images were obtained by using Leica DMD 108 microscope (Leica, Germany).

TRAP staining is used to identify TRAP-positive cells as osteoclast in bone tissue. HES staining is essential for visualizing morphological cells, nucleus, cytoplasm and for identifying morphology alterations in tissues. This staining facilitates the recognition of different tissue in a histological section. Alcian blue stains especially GAG chains a blue color, whereas kernechtrot stains nucleus a pink color. Safranin-O/Fast green staining is frequently used to stain articular cartilage and growth plate. Therefore, Safranin-O by its hydrophobic group stains GAG chains attached to PGs with a red-orange color and Fast green binds to non-collagenous protein which are stained with green color. Hematoxylin identify the nucleus by the staining of nucleic acids a deep blue-purple color, eosin stains proteins non-specifically a pink color, whereas safran stains collagen fibers a yellow color. Therefore, in knee-sections, nuclei are stained blue purple, cytoplasm and matrix are

stained pink which exhibits varying degrees. Red Sirius is a typical hydrophile dye that stains collagen fibers a pink color.

Second harmonic generation microscopy (SHG)

To visualize collagen fibers in ECM of growth plate we used multi-photons excitation microscope having water immersion objective lens and a Ti: sapphire laser oscillator system. The 8-weeks-old tibias specimens were collected and treated (see previously, histological analysis and staining) then were cut in 10 microns sections. Following dewaxing and mounting, sections were evaluated by SHG microscopy as described before (52).

RNAscope in situ hybridization procedures

RNA *in situ* hybridization on mice knee joint sections was performed as previously described (53) with a few modifications. Briefly, 5 microns tissue sections were dewaxing at 60°C, then in xylene, followed by dehydration in an ethanol series. Tissue sections were then incubated in citrate buffer (10 nmol/L, pH 6) maintained at 96°C in an incubator for 15 minutes, rinsed in wash buffer, and immediately treated with 10 g/mL protease (ACD) at 40°C for 30 minutes in a HybEZ hybridization oven (ACD, Hayward, CA). Hybridization with target probes, preamplifier, amplifier, and label probe and chromogenic detection was performed using DAB followed by counterstaining with hematoxylin dehydrating and mounting. Here, we used probes purchased from ACD company, against mice: *Col10a1*, *β -Glap*, *Spp1*, *Col2a1*, *Ihh* and *Acan*. RNA hybridization images were obtained by using Leica DMD 108 microscopy.

Immunohistochemistry and antibodies

Immunohistochemical analysis was performed on the paraffin-embedded sections prepared from knee joints of 10-days-old mice using the Dako Envision kit. Paraffin-embedded sections were dewaxing in alcohol baths, then washed two times by PBS, followed by citrate treatment for overnight at 55°C. Subsequently, sections were blocked, incubated with primary and secondary antibodies and mounted. Primary antibodies and dilutions used were: TGF β R2 (Gene Tex, 1/300), TGF β R3 (Santa Cruz, 1/200), Wnt4 (Santa Cruz, 1/500), pSmad2 (Cell Signaling, 1/100) and phosphor-H3 (Celle Signaling, 1/200). Immunohistochemistry images were obtained by using Leica DMD 108 microscopy.

TGFβR1 inhibitor (LY364947) injection

One week old *Col2a1-CreERTM;XylT1^{flox/flox}* mice were randomly distributed between four groups, each one was composed of 4 mice. The first group (G1, control) received corn oil vehicle injections with DMSO. The second group (G2) was injected with tamoxifen and DMSO solution and the last group (G3) was injected with tamoxifen solution and TGFβR1 inhibitor. Injection was done intraperitoneally at one-week-old followed by 3 injections at three, five and seven weeks old. The mice skeleton length was measured with digital electronic caliper at 8 weeks old.

Primary long bone osteoblast isolation and culture

The primary osteoblasts were isolated from the long bones of the WT and XylT1-cKO mice aged 6 weeks as described previously [46]. Briefly, the long bones were separated after removed the excessive tissue and washed with PBS. The cartilaginous part of both bone ends was cut, and the bone was cut into small pieces. These bone portions were washed 3 times with PBS and incubated in a solution of collagenase D (2 mg/ml, Roche, Germany) prepared in Eagle's minimum essential medium; αMEM medium (Lonza) supplemented with 1% glutamine (200 mM) and 1% penicillin/streptomycin (10000 U/ml), for 2 hours at 37 ° C, 5% CO₂ under a humid atmosphere. Each 30 min, the solution containing the bone portions was shaken. After 2 h of incubation, these pieces were washed 3 times with the culture medium (αMEM, supplemented with 1% glutamine and 1% penicillin/streptomycin and 10% FCS), then transferred into 25 cm² flasks containing 6 ml of culture medium. After each change of medium, it is necessary to check that the pieces are well distributed. The migration of osteoblasts begins after 3 to 5 days of incubation.

Real-time Quantitative PCR (RT-qPCR)

Total RNA from osteoblasts cells was isolated using the RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany). RNA concentration was measured by Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA). The absorbance ratio at 260 nm and 280 nm is used to evaluate the purity of the RNA (a ratio of ~ 2.0 is generally accepted as pure RNA). The first strand cDNA synthesis reaction was performed using 500 ng of total RNA with oligo (dT) primer and iScriptTM Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad). Quantitative PCR was carried out using iTaqTM Universal SYBER Green Supermix kit (Bio-Rad, Hercules, CA) and validated RT- PCR primers set for mice are shown in table 2. Cycling parameters were 30 s at 95 ° C; 40 cycles of 15 s at 95 ° C and 1 min à 60 ° C. Gene expression

was determined in triplicate in three separate experiments and normalized using the housekeeping genes ribosomal protein S29 and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Analyses and fold differences between the WT and XylT1-cKO mice were determined with the formula $2^{-\Delta\Delta CT}$, and the data are relative to the control values (WT). The expression change was calculated from the values of $\Delta\Delta CT$.

Statistics

Differences between experimental groups were assessed using ANOVA test and t-test. The significance threshold was at $P \leq 0.05$. Statistical analyses were performed using GraphPad PRISM (v6). All values are shown as mean \pm SD.

Acknowledgements

We thank professor Samir Taha and Chaza Harmouch for helpful discussion and the University of Lebanon and AZM and Saade association for Mrs Ghannoum's scholarship.

Conflict of interest

The authors disclose no conflict of interest

FUNDING

Generation of mutant mice was funded by a grant from INSERM.

References

1. De Andrea, C.E., Prins F. A., Wiweger, M.I., Hogendoorn, P.C. (2011) Growth plate regulation and osteochondroma formation: insights from tracing proteoglycans in zebrafish models and human cartilage, *J. Pathol.*, **224**, 160–168.
2. Myhre, K., Blobe, G.C. (2009) Proteoglycan Signaling Co-receptors: Roles in Cell Adhesion, Migration and Invasion, *Cell. Signal.*, **21**, 1548–1558.
3. Yan, D., Lin, X. (2009) Shaping morphogen gradients by proteoglycans, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **1**, a002493.
4. Cortes, M., Baria, A.T., Schwartz, N.B. (2009) Sulfation of chondroitin sulfate proteoglycans is necessary for proper Indian hedgehog signaling in the developing growth plate, *Dev. Camb. Engl.*, **136**, 1697–1706.
5. Iozzo, R.V., Schaefer, L. (2015) Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans, *Matrix Biol.*, **42**, 11–55.
6. Prydz, K., Dalen, K.T. Synthesis and sorting of proteoglycans, *J. Cell Sci.*, **113**, 193–205.
7. Kearns, A.E., Campbell, S.C., Westley, J., Schwartz, N.B. (1991) Initiation of chondroitin sulfate biosynthesis: a kinetic analysis of UDP-D-xylose: core protein beta-D-xylosyltransferase, *Biochemistry (Mosc.)*, **30**, 7477–7483.
8. Schön, S., Prante, C., Bahr, C., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C. (2006) Cloning and recombinant expression of active full-length xylosyltransferase I (XT-I) and characterization of subcellular localization of XT-I and XT-II, *J. Biol. Chem.*, **281**, 14224–14231.
9. Müller, S., Schöttler, M., Schön, S., Prante, C., Brinkmann, T., Kuhn, J., Götting, C., Kleesiek, K. (2005) Human xylosyltransferase I: functional and biochemical characterization of cysteine residues required for enzymic activity, *Biochem. J.*, **386**, 227–236.

10. Malfait, F., Kariminejad, A., Van Damme, T., Gauche, C., Syx, D., Merhi-Soussi, F., Gulberti, S., Symoens, S., Vanhauwaert, S., Willaert, A., Bozorgmehr, B., Kariminejad, MH., Ebrahimiadib, N., Hausser, I., Huysseune, A., Fournel-Gigleux, S., De Paepe, A. (2013) Defective initiation of glycosaminoglycan synthesis due to B3GALT6 mutations causes a pleiotropic Ehlers-Danlos-syndrome-like connective tissue disorder, *Am. J. Hum. Genet.*, **92**, 935–945.
11. Cartault, F., Munier, P., Jacquemont, ML., Vellayoudom, J., Doray, B., Payet, C., Randrianaivo, H., Laville, J.M., Munnich, A., Cormier-Daire, V. (2015) Expanding the clinical spectrum of B4GALT7 deficiency: homozygous p.R270C mutation with founder effect causes Larsen of Reunion Island syndrome, *Eur. J. Hum. Genet. EJHG*, **23**, 49–53.
12. Nakajima, M., Mizumoto, S., Miyake, N., Kogawa, R., Iida, A., Ito, H., Kitoh, H., Hirayama, A., Mitsubuchi, H., Miyazaki, O., Kosaki, R., Horikawa, R., Lai, A., Mendoza-Londono, R., Dupuis, L., Chitayat, D., Howard, A., Leal, G.F. *et al.* (2013) Mutations in B3GALT6, which encodes a glycosaminoglycan linker region enzyme, cause a spectrum of skeletal and connective tissue disorders, *Am. J. Hum. Genet.*, **92**, 927–934.
13. Budde, B.S., Mizumoto, S., Kogawa, R., Becker, C., Altmüller, J., Thiele, H., Rüschemdorf, F., Toliat, M.R., Kaleschke, G., Hämmerle, J.M., Höhne, W., Sugahara, K., Nürnberg, P., Kennerknecht, I., (2015) Skeletal dysplasia in a consanguineous clan from the island of Nias/Indonesia is caused by a novel mutation in B3GAT3, *Hum. Genet.*, **134**, 691–704.
14. Bui, C., Huber, C., Tuysuz, B., Alanay, Y., Bole-Feysot, C., Leroy, JG., Mortier, G., Nitschke, P., Munnich, A., Cormier-Daire, V. (2014) XYLT1 Mutations in Desbuquois Dysplasia Type 2, *Am. J. Hum. Genet.*, **94**, 405–414.
15. Schreml, J., Durmaz, B., Cogulu, O., Keupp, K., Beleggia, F., Pohl, E., Milz, E., Coker, M., Ucar, S.K., Nürnberg, G., Nürnberg, P., Kuhn, J., Ozkinay, F. (2013) The missing ‘link’: an autosomal recessive short stature syndrome caused by a hypofunctional XYLT1 mutation, *Hum. Genet.*, **133**, 29–39.
16. Silveira, C., Leal, G.F., Cavalcanti, D.P. (2016) Desbuquois dysplasia type II in a patient with a homozygous mutation in XYLT1 and new unusual findings, *Am. J. Med. Genet. A.*, **170**, 3043–3047.

17. Jamsheer, A., Olech, E.M., Kozłowski, K., Niedziela, M., Sowińska-Seidler, A., Obara-Moszyńska, M., Latos-Bieleńska, A., Karczewski, M., Zemojtel, T. (2016) Exome sequencing reveals two novel compound heterozygous XYLT1 mutations in a Polish patient with Desbuquois dysplasia type 2 and growth hormone deficiency, *J. Hum. Genet.*, **61**, 577–583.
18. Al-Jezawi, N.K., Ali, B.R., Al-Gazali, L. (2017) Endoplasmic reticulum retention of xylosyltransferase 1 (XYLT1) mutants underlying Desbuquois dysplasia type II, *Am. J. Med. Genet. A.*, **999**, 1-9.
19. Faivre, L., Cormier-Daire, V., Elliott, A.M., Field, F., Munnich, A., Maroteaux, P., Le Merrer, M., Lachman, R. (2004) Desbuquois dysplasia, a reevaluation with abnormal and ‘normal’ hands: radiographic manifestations, *Am. J. Med. Genet. A.*, **124A**, 48–53.
20. Eames, B.F., Yan, Y.L., Swartz, M.E., Levic, D.S., Knapik, E.W., Postlethwait, J.H., Kimmel, C.B. (2011) Mutations in fam20b and xytl1 reveal that cartilage matrix controls timing of endochondral ossification by inhibiting chondrocyte maturation, *PLoS Genet.*, **7**, e1002246.
21. Mis, E.K., Liem, K.F., Kong, Y., Schwartz, N.B., Domowicz, M., Weatherbee, S.D. (2014) Forward genetics defines Xylt1 as a key, conserved regulator of early chondrocyte maturation and skeletal length, *Dev. Biol.*, **385**, 67–82.
22. Prein, C., Warmbold, N., Farkas, Z., Schieker, M., Aszodi, A., Clausen-Schaumann, H. (2016) Structural and mechanical properties of the proliferative zone of the developing murine growth plate cartilage assessed by atomic force microscopy, *Matrix Biol.*, **50**, 1–15.
23. Yang, J., Andre, P., Ye, L., Yang, Y.Z. (2015) The Hedgehog signalling pathway in bone formation, *Int. J. Oral Sci.*, **7**, 73–79.
24. Chen, G., Deng, C., Li, Y.P. (2012) TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation, *Int. J. Biol. Sci.*, **8**, 272–288.
25. Le Goff, C., Cormier-Daire, V. (2015) Chondrodysplasias and TGF β signaling, *BoneKey Rep.*, **4**, 1-7.

26. Lee, H.H., Behringer, R.R. (2007) Conditional Expression of Wnt4 during Chondrogenesis Leads to Dwarfism in Mice, *PLoS ONE*, **2**, e450.
27. Hartmann, C., Tabin, C.J. (2012) Dual roles of Wnt signaling during chondrogenesis in the chicken limb, *Dev. Camb. Engl.*, **127**, 3141–3159.
28. Staines, K.A., MacRae, V.E., Farquharson, C. (2012) The importance of the SIBLING family of proteins on skeletal mineralisation and bone remodeling, *J. Endocrinol.*, **214**, 241–255.
29. Maeda, Y., Nakamura, E., Nguyen, M.T., Suva, L.J., Swain, F.L., Razzaque, M.S., Mackem, S., Lanske, B. (2007) Indian Hedgehog produced by postnatal chondrocytes is essential for maintaining a growth plate and trabecular bone, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**, 6382–6387.
30. Roberts, C.R., Paré, P.D. (1991) Composition changes in human tracheal cartilage in growth and aging, including changes in proteoglycan structure, *Am. J. Physiol.*, **261**, L92-101.
31. Reinhardt, A.K., Bottoms, S.E., Laurent, G.J., McAnulty, R.J. (2005) Quantification of collagen and proteoglycan deposition in a murine model of airway remodelling,” *Respir. Res.*, **6**, 30.
32. Mizumoto, S., Yamada, S., Sugahara, K. (2014) Human genetic disorders and knockout mice deficient in glycosaminoglycan, *BioMed Res. Int.*, **2014**, 495764.
33. Rossi, A., Kaitila, I., Wilcox, W.R., Rimo, D.L., Steinmann, B., Cetta, G., Superti-Furga, A. (1998) Proteoglycan sulfation in cartilage and cell cultures from patients with sulfate transporter chondrodysplasias: relationship to clinical severity and indications on the role of intracellular sulfate production, *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.*, **17**, 361–369.
34. Kvist, A.J., Johnson, A.E, Mörgelin, M., Gustafsson, E., Bengtsson, E., Lindblom, K., Aszódi, A., Fässler, R., Sasaki, T., Timpl, R., Aspberg, A. (2006) Chondroitin sulfate perlecan enhances collagen fibril formation. Implications for perlecan chondrodysplasias, *J. Biol. Chem.*, **281**, 33127–33139.

35. Sato, T., Kudo, T., Ikehara, Y., Ogawa, H., Hirano, T., Kiyohara, K., Hagiwara, K., Togayachi, A., Ema, M., Takahashi, S., Kimata, K., Watanabe, H., Narimatsu, H. (2011) Chondroitin Sulfate N-Acetylgalactosaminyltransferase 1 Is Necessary for Normal Endochondral Ossification and Aggrecan Metabolism, *J. Biol. Chem.*, **286**, 5803–5812.
36. Li, S.W., Prockop, D.J., Helminen, H., Fässler, R., Lapveteläinen, T., Kiraly, K., Peltarri, A., Arokoski, J., Lui, H., Arita, M., *et al.* (1995) Transgenic mice with targeted inactivation of the Col2 alpha 1 gene for collagen II develop a skeleton with membranous and periosteal bone but no endochondral bone, *Genes Dev.*, **9**, 2821–2830.
37. Zhou, X., von der Mark, K., Henry, S., Norton, W., Adams, H., de Crombrughe, B. (2014) Chondrocytes Transdifferentiate into Osteoblasts in Endochondral Bone during Development, Postnatal Growth and Fracture Healing in Mice, *PLOS Genet.*, **10**, e1004820.
38. Aghajanian, P., Subbaraman, M. (2018) The art of building bone: emerging role of chondrocyte-to-osteoblast transdifferentiation in endochondral ossification, *Bone Research*, **6**, 1-9.
39. Marcucio, R., Hu, D., Yang, F., Bahney, C., Miclau, T. (2016) Transdifferentiation of Chondrocytes to Osteoblasts during Bone Fracture Healing, *FASEB J.*, **30**, 223.1-223.1.
40. Klüppel, M., Wight, T.N., Chan, C., Hinek, A., Wrana, J.L. (2005) Maintenance of chondroitin sulfation balance by chondroitin-4-sulfotransferase 1 is required for chondrocyte development and growth factor signaling during cartilage morphogenesis, *Development*, **132**, 3989–4003.
41. Huang, C.-Y.C., Hagar, K.L., Frost, L.E., Sun, Y., Cheung, H.S. (2004) Effects of cyclic compressive loading on chondrogenesis of rabbit bone-marrow derived mesenchymal stem cells, *Stem Cells Dayt. Ohio*, **22**, 313–323.
42. Canty, E.G., Kadler, K.E. (2005) Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis, *J. Cell Sci.*, **118**, 1341–1353.
43. Forlino, A., Marini, J.C. (2016) Osteogenesis imperfecta, *Lancet Lond. Engl.*, **387**, 1657–1671.

44. Fisher, L.W., Torchia, D.A., Fohr, B., Young, M.F., Fedarko, N.S. (2001) Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **280**, 460–465.
45. Sodek, J., Ganss, B., McKee, M.D. (2000) Osteopontin, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, **11**, 279–303.
46. Denhardt, D.T., Noda, M., O'Regan, A.W., Pavlin, D., Berman, J.S. (2001) Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival, *J. Clin. Invest.*, **107**, 1055–1061.
47. Boskey, A.L., Spevak, L., Paschalis, E., Doty, S.B., McKee, M.D. (2002) Osteopontin deficiency increases mineral content and mineral crystallinity in mouse bone, *Calcif. Tissue Int.*, **71**, 145–154.
48. Franzén, A., Hulthenby, K., Reinholt, F.P., Onnerfjord, P., Heinegård, D. (2008) Altered osteoclast development and function in osteopontin deficient mice, *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.*, **26**, 721–728.
49. Lu, C., Huang, S., Mclau, T., Helms, J.A., Colnot, C. (2004) MEPE is expressed during skeletal development and regeneration, *Histochem. Cell Biol.*, **121**, 493–499.
50. Chen, H., Ghori-Javed, F.Y., Rashid, H., Adhami, M.D., Serra, R., Gutierrez, S.E., Javed, A. (2014). Runx2 Regulates Endochondral Ossification through Control of Chondrocyte Proliferation and Differentiation. *Journal of Bone and Mineral Research*, **29**, 2653-2665.
51. Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., de Crombrughe, B. (2002) The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation, *Cell*, **108**, 17–29.
52. Saitou, T., Kiyomatsu, H., Imamura, T. (2018) Quantitative Morphometry for Osteochondral Tissues Using Second Harmonic Generation Microscopy and Image Texture Information, *Sci. Rep.*, **8**, 2826.

53. Wang, F., Flanagan, J., Su, N., Wang, L.C., Bui, S., Nielson, A., Wu, X., Vo, H.T., Ma, X.J., Luo, Y. (2012) RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues, *J. Mol. Diagn. JMD*, **14**, 22–29.

54. Bakker, A.D., Klein-Nulend, J. (2012) Osteoblast isolation from murine calvaria and long bones, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, **816**, 19–29.

Figure Legends

Figure 1 Generation of *Col2a1-CreERTM;XylTI^{flox/flox}* mice

Scheme of different mice strains and strategy used for the generation of *Col2a1-CreERTM;XylTI^{flox/flox}* mice.

Figure 2 *Col2a1-CreERTM;XylTI^{flox/flox}* mice display reduced skeletal body and elements length

Panel A. Graph showing cKO mice body length compared to WT littermates at 8 weeks-old. Values are normalized such that wild-type body length are set to 100%. Knockout postnatal mice skeletons display 20% reduction in body length at 8-week-old compared to wild-type

Panels B and C. Adult 8 weeks-old cKO mice show an overall reduction in body size, in addition to shortened snouts, limbs, and tails compared to WT littermates.

Panel D. Graph showing cKO elements length compared to WT littermate at 8-week-old. Values are normalized such that WT femurs and tibias are set to 100%. cKO postnatal mice display 25% reduction in femurs length and a 30% reduction in Tibia at 8-week-old.

Panels E and F. Adult 8-week-old cKO mice show a reduction in femurs length compared to WT littermate. Scale bar in **E** and **F** = 0.75cm.

Figure 3 *Col2a1-CreERTM;XylTI^{flox/flox}* mice showed defects in different skeleton elements and pronounced ossification

Panels A to J. Postnatal skeleton mice; red = bone marked by alizarin red staining; blue = cartilage marked by alcian blue staining.

Panel A. cKO postnatal mice showed a dwarfism phenotype characterized by shortened axial and appendicular skeletons.

Panels B and C. Adult skeletons reveal shortening of the skull (**B**), and smaller rib cage with broadening of the ribs (**C**, red circles) in cKO mice compared to WT.

Panel D. Adult cKO mice display reduced disc cartilage that separate the spine bones compared to WT littermates. **E**, Adult trachea mice show an early ossification marked by red staining and defects in cartilage marked by blue staining in cKO mice compared to WT.

Panel F. cKO mice displayed reduced tail length. **G-J,** Adult mice limbs reveal shortening in humerus (**G**), Ulna/Radius (**H**), femurs (**I**), tibias/Fibulas (**J**) of cKO mice compared to WT.

Figure 4 8-week-old XylT1 deficient mice cKO display trabecular number reduction and increased trabecular and cortical thickness

Panels A-A''', B-B''', μ CT scans of cKO and WT control femurs revealed defects in trabecular bone content within the diaphysis and cortical bone in cKO mutants. There is a reduced trabecular number with some regions showing higher density (marked in red **B''**) and others displaying lower density in cKO mice (**B-B''**). Concerning the cortical thickness, μ CT analysis showed more thicker cortical bone in cKO mice (**B'''**) compared to WT littermate (**A'''**).

Panel C. Graph showing several measurements of trabecular and cortical bone parameters. Values are normalized such the control is defined as 1. cKO mice show an increase in the thickness of the trabecular and cortical bone, while the trabecular number is reduced. Regarding the other parameters, cKO mice did not show any significant difference from WT.

Panels D and E. cKO mice showed a larger femoral epiphysis (E, white square), and an abnormality of the femoral head that appears to be more developed and more ossified than that of WT mice.

Figure 5 Histological studies of the growth plate of 10-day-old mice

Panels A to D. Alcian blue staining, a specific dye of GAG chains and Hematoxylin/Eosin/Safran staining of 5 μ m tibias sections.

Panel A. Growth plate staining revealed less PGs staining and disorder of growth plate organization.

Panel B. Resting zone does not show morphological differences between WT and cKO mice.

Panel C. Proliferative zone shows disordered cellular organization and morphology. The chondrocytes show a round shape (red arrows), a huddling next to each other with a reduced extracellular matrix (red circle) less PGs staining in cKO mice.

Panel D. Reduced pre and hypertrophic zones in cKO mice. Scale bar: 100 μ m.

Figure 6 Histological studies of the growth plate of mice aged 4 weeks

Panels A and B. Alcian blue staining, a specific dye of GAG chains and Hematoxylin/Eosin/Safran staining of 5 μm knee joints sections. cKO mice show a less GAG synthesis and disruption of columnar organization without differences in hypertrophic zone.

Panel C. Graph showing the relative thickness of the growth plate in cKO mice compared to WT mice. These mice show a reduction in the thickness of their growth plate. Statistical significance is assessed using t-test, $p < 0.05$ (*). Scale bar: 100 μm .

Figure 7 Histological studies of the growth plate of mice aged 8 weeks

Panel A. Alcian blue staining, a specific dye of GAG chains. cKO mice show a less GAG synthesis.

Panel B. Hematoxylin/Eosin/Safran staining. cKO mice show disruption of columnar organization without differences in hypertrophic zone.

Panel C. Graph showing the relative thickness of the growth plate in cKO mice compared to WT mice. These mice show a small reduction in the thickness of their growth plate. Scale bar: 100 μm .

Figure 8 Matrix collagen fibers abundance and its arrangement defect in XylT1-deficient mice aged 8 weeks

Panels i to vi. Images taken by SHG harmonic technology of tibias histological sections of 8-week-old mice. The sections studied measured 10 μm .

Panels I and ii. Alignment and abundance of collagen fibers in WT and cKO mice. Collagen fibers are thicker, and they are not well aligned in cKO mice of collagen fibers and show.

Panels iii and iv. The distribution of cells in growth plate.

Panels v and vi. Merge between collagen fibers and cells. Scale bar: 40 μm .

Figure 9 Tibias in situ hybridization of chondrogenic and osteogenic markers in XylT1-deficient mice aged 4 weeks

Panel A. Chondrogenic markers (Acan, Col2 α 1 and Col10) mRNA expression. In Situ hybridization showed increased expression of these markers in cKO mice compared to WT.

Panel B. osteogenic markers (β -Glap and Spp1) are more expressed in cKO mice. Spp1 or osteopontin mRNA expression is strong especially at chondro-osseous junction and spongy bone of XylT1 deficient mice.

Figure 10 Overexpression of Ihh and Wnt4 on tibias sections of XylT1 deficient mice aged 10 days

Panel A. *In Situ* hybridization of Ihh in the growth plate. cKO mice showed an overexpression of Ihh compared to WT in pre-hypertrophic zone.

Panel B. Wnt4 expression in the growth plate. iii, iv, Wnt4 expression in resting zone and articular surface. v, vi, Wnt4 expression in proliferative and hypertrophic zones. In all these zones, cKO mice showed an overexpression of Wnt4 compared to WT. R.Z - Resting zone, P.Z - Proliferative zone, H.Z - Hypertrophic zone. Scale bar: 100 μ m.

Figure 11 Decreased phospho-H3 expression in XylT1-cKO mice aged 10 days

Panel A. Immunohistochemistry of phospho-H3 in growth plate. XylT1-cKO showed a decrease of H3 expression in proliferative and columnar zones. Z1: proliferative zone ; Z2: columnar zone. Scale bar: 100 μ m.

Panel B. Quantification of phospho-H3 positive cells in proliferative and columnar zones showed decrease of proliferation in XylT1-cKO mice compared to WT.

Figure 12 Immunohistochemistry of TGF β R2 and pSmad2 on tibias sections of XylT1 deficient mice aged 10 days

Panel A. Immunohistochemistry of TGF β R2 in the growth plate. iii, iv, TGF β R2 expression in resting zone. v, vi, TGF β R2 expression in proliferative zone. vii, viii, TGF β R2 expression in hypertrophic zone. In all these zones, cKO mice showed an overexpression of TGF β R2 compared to WT.

Panel B. Immunohistochemistry of pSmad2 in the growth plate showed overexpression of pSmad2 in XylT1-cKO mice. Scale bar: 100 μ m.

Figure 13 TGFβR2 inhibitor restores body length of XylT1-deficient mice aged 8 weeks

Panel A. Image of mice groups; G1 represents the control group injected with corn oil and DMSO, G2 represents the group of cKO without treatment with inhibitor and G3 represents the test group injected with TGFβR2 inhibitor.

Panel B. Mean body length measurements of mice groups. TGFβR2 inhibitor restores growth in G3 compare to G2.

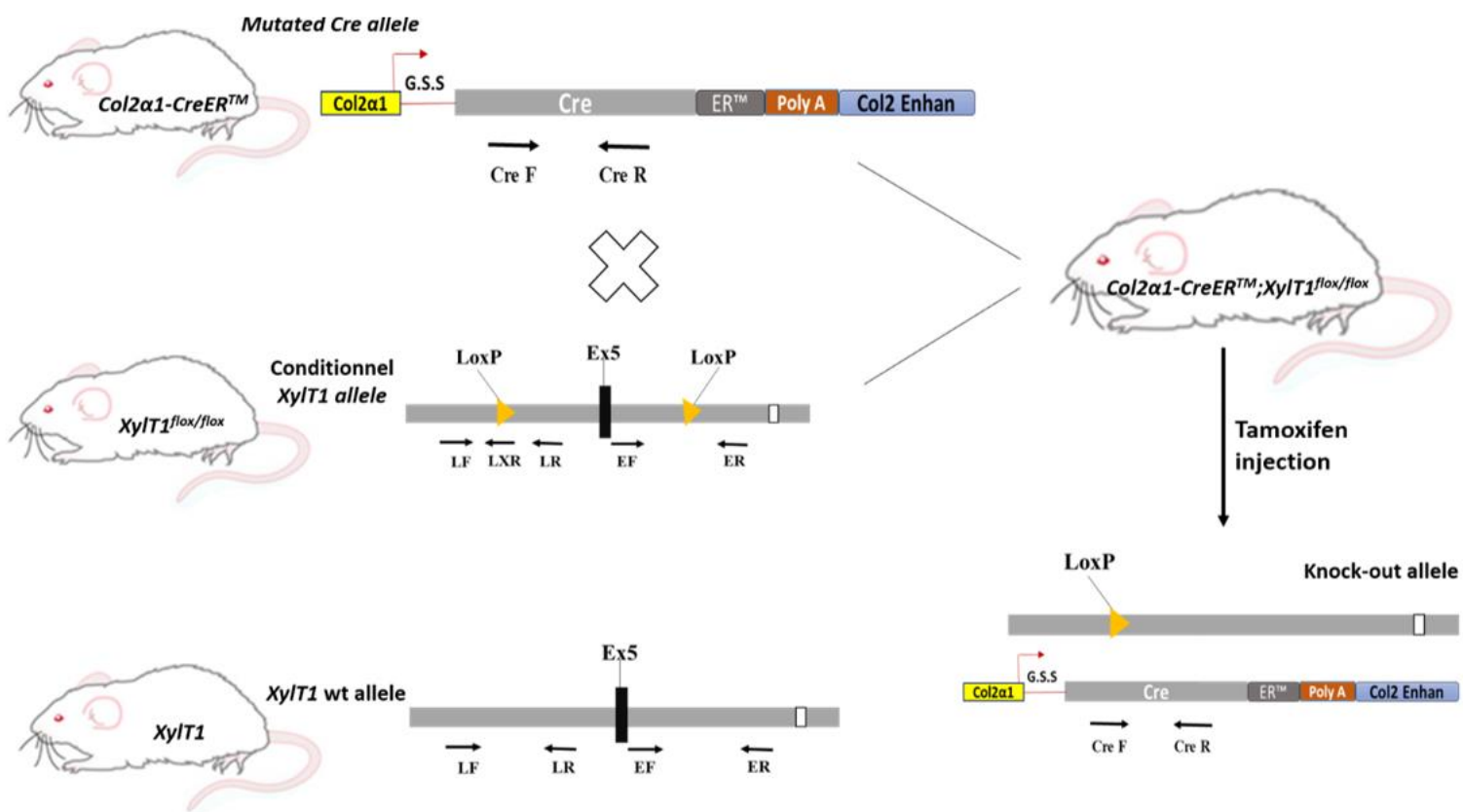
Figure 14 Remarkable increased osteoclast numbers in *Col2a1-CreERTM;XYLT1^{lox/lox}* mice aged 8 weeks

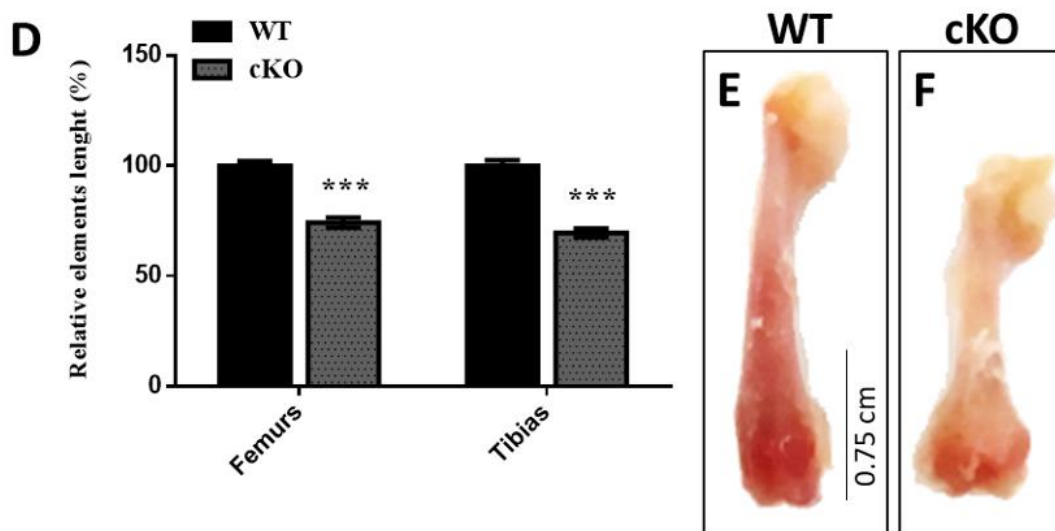
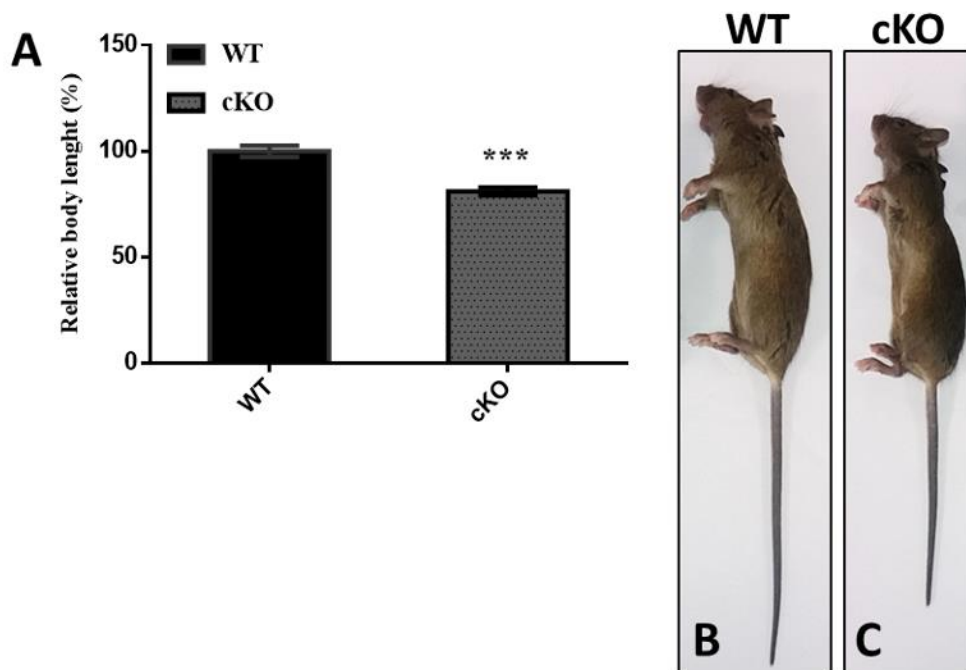
Panel A. TRAP staining for the detection of osteoclasts (red spots) was performed on histological sections of Tibias bone of mice aged 8-week-old and counter-stained with Fast-Green solution. The two black and red squares delimit the cancellous bone and the cortical bone respectively. i, ii, photos taken at (x4) magnification in wild (WT) and mutated (cKO) mice. iii, iv, photos taken at a magnification of (x10) at the cancellous bone of the mice. v, vi, photos taken at the level of the cortical bone.

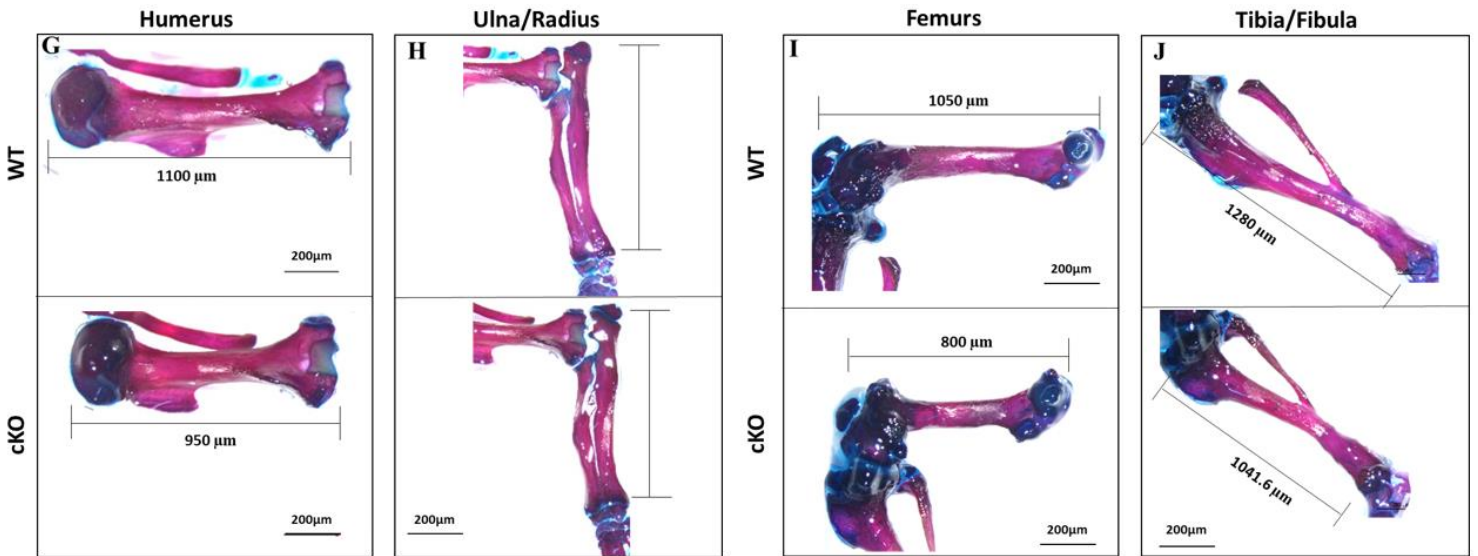
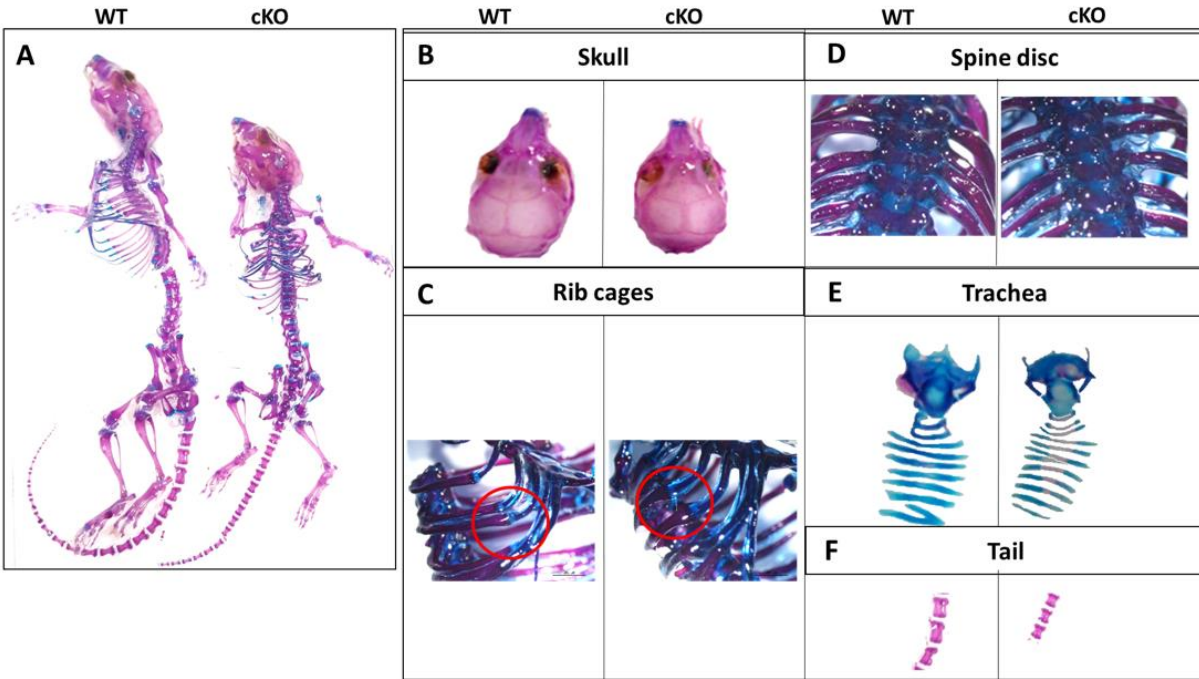
Panel B. Quantification of the number of osteoclasts per bone surface (Oc.N/B.S). Red arrows indicate osteoclasts. Scale bar: 100 μm.

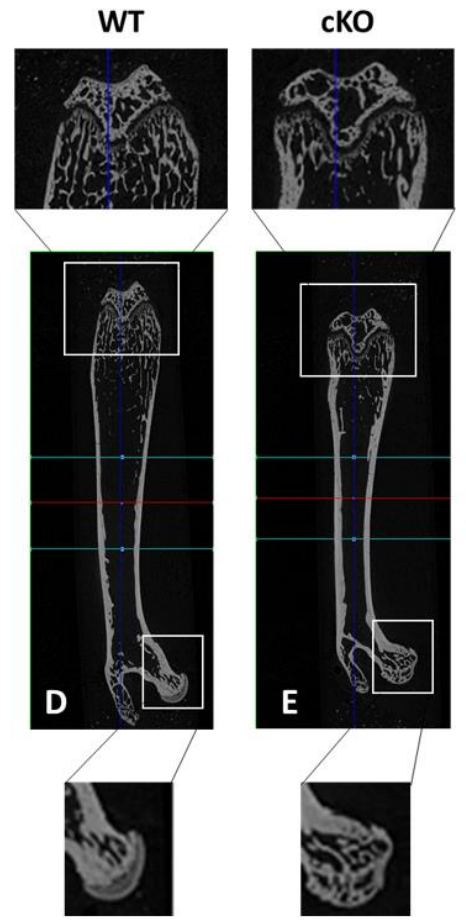
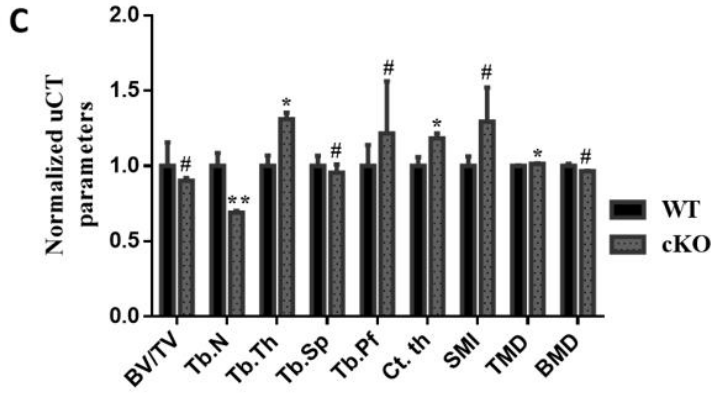
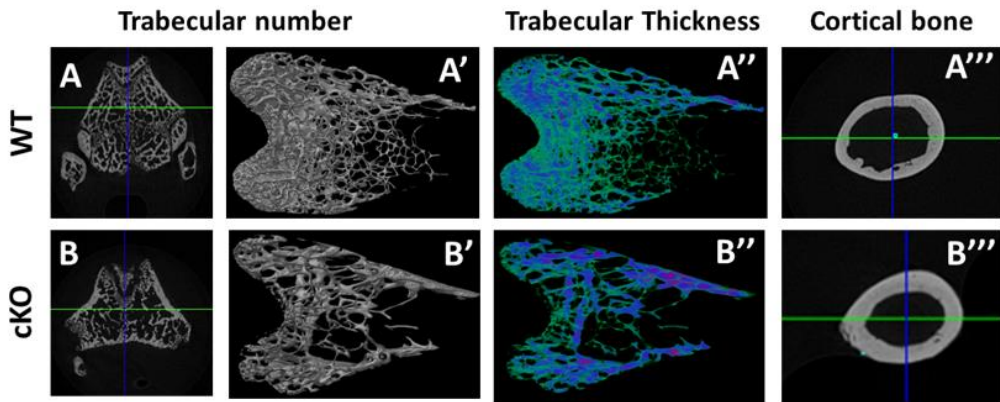
Figure 15 Effect of XylT1 deficiency on osteoblast activity derived from long bones

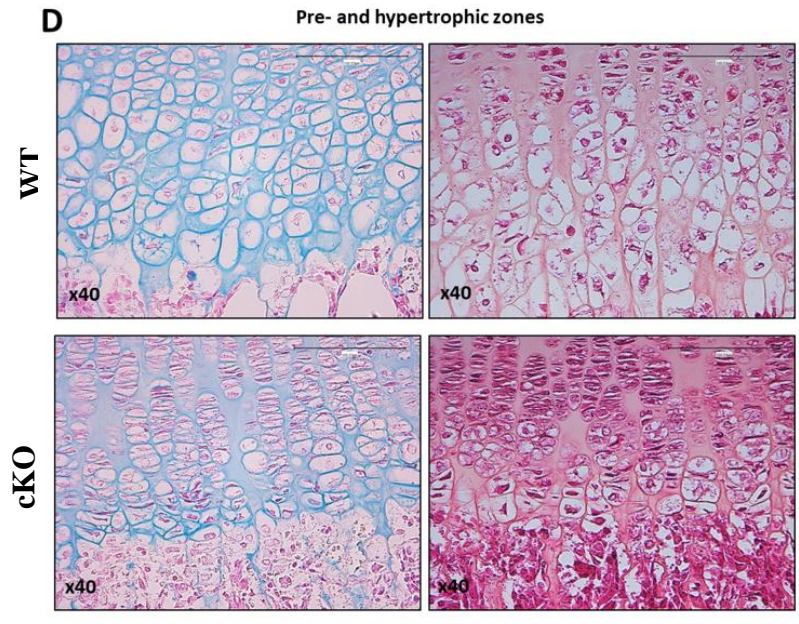
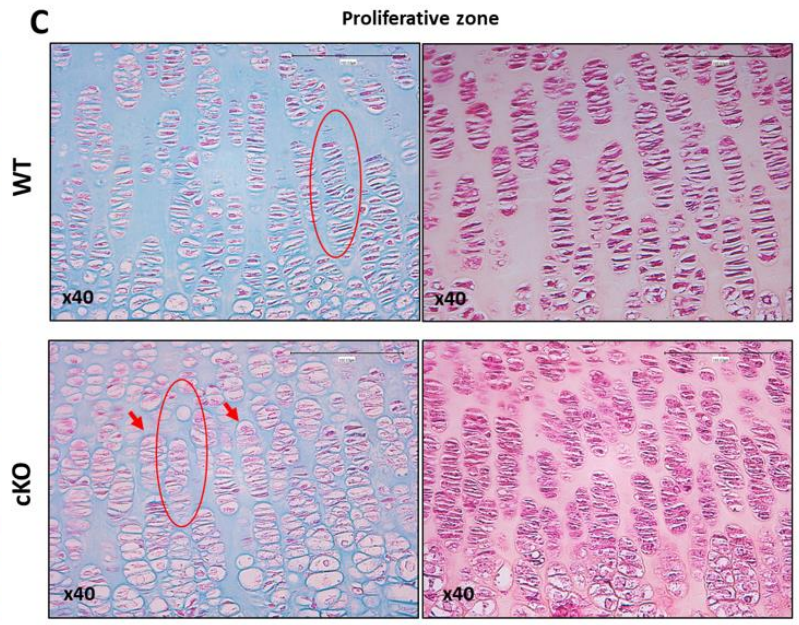
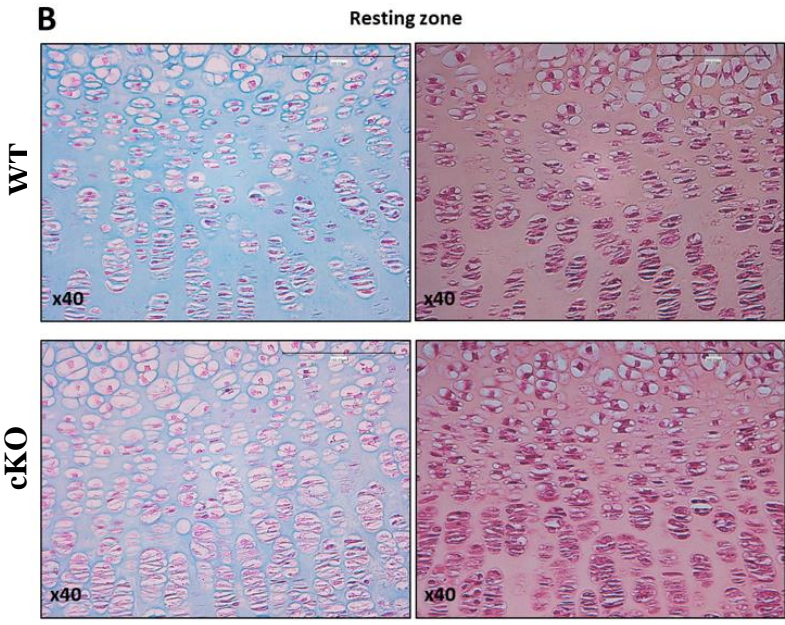
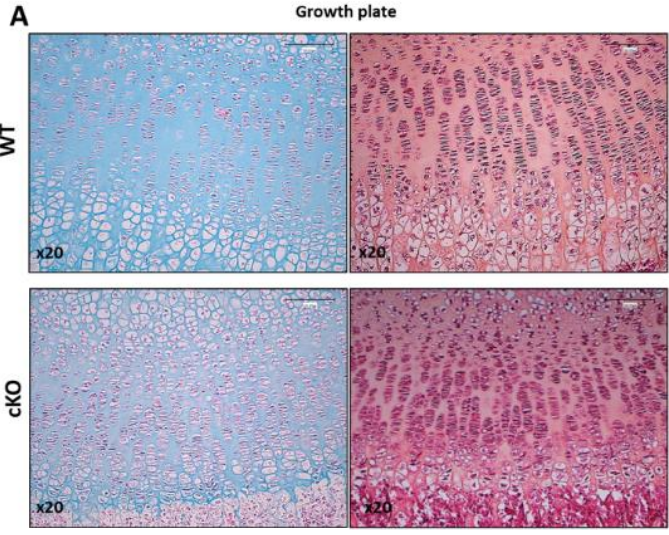
Expression level of mRNA in cultured osteoblasts derived from long bones of wild-aged (WT) and mutated (XylT1-cKO) mice aged 6 weeks. mRNA expression level of OPN, Osx, DMP1, MEPE and Col1 are determined by RT-PCR in real time. Values are normalized such as WT measurements are defined as 1. Genes expression is normalized to the reporter gene S29 and Gapdh. Statistical significance is assessed using the t-test, p <0.05 (*), p <0.01 (**), p <0.001 (***), #: not significant.

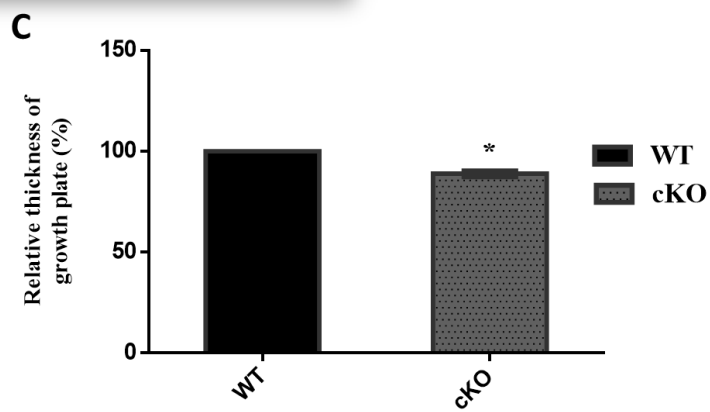
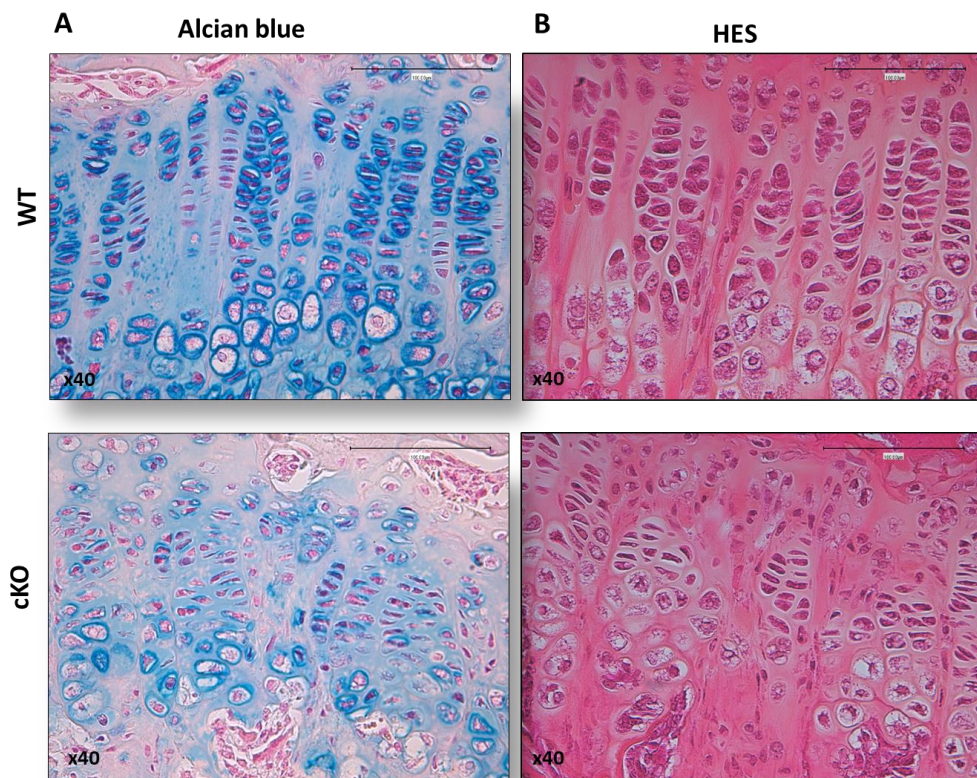


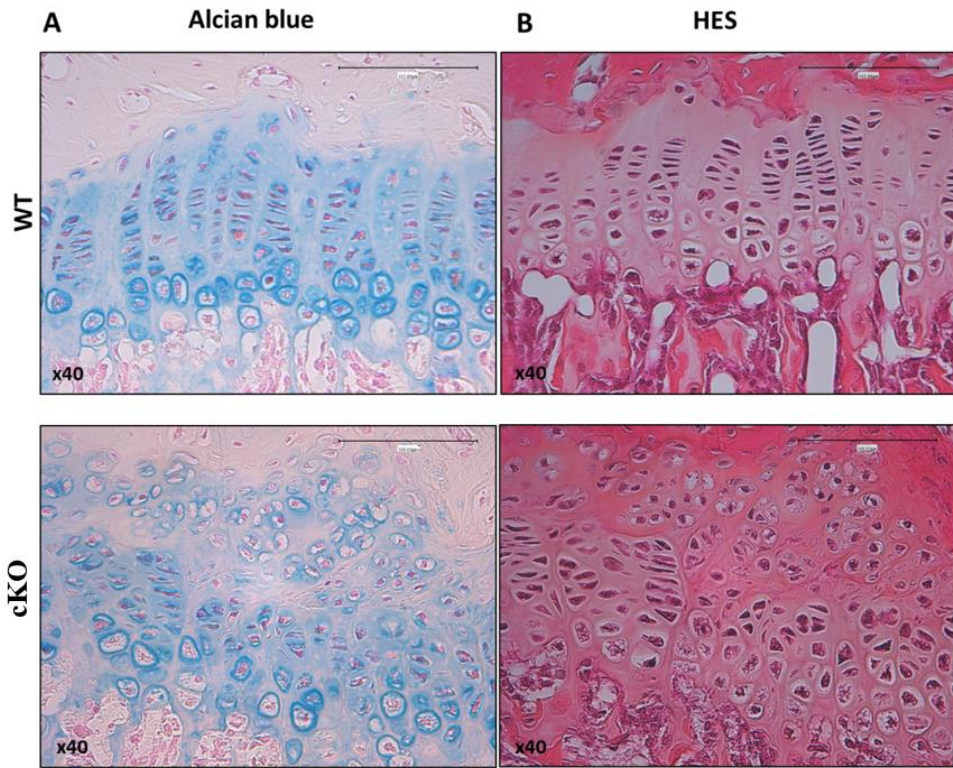










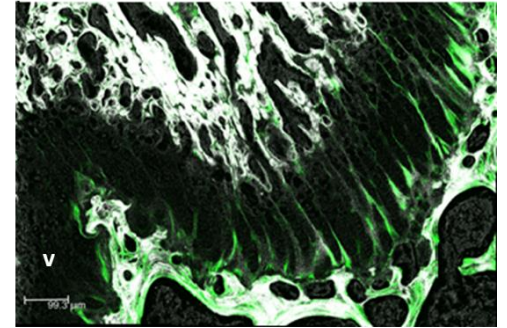
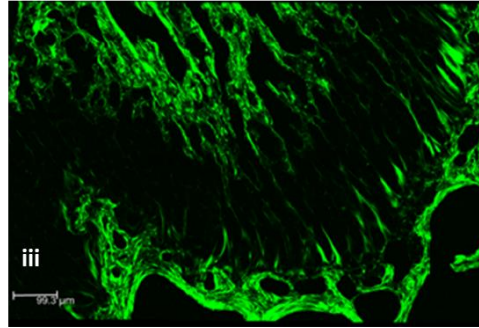
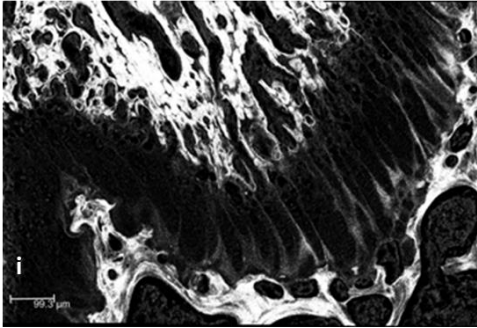


Autofluorescence

SHG

Merge

WT



CKO

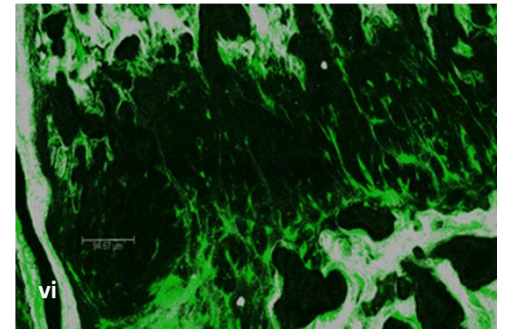
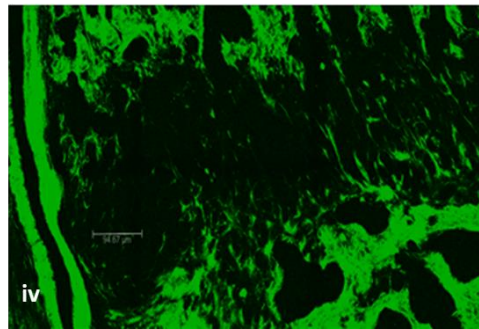
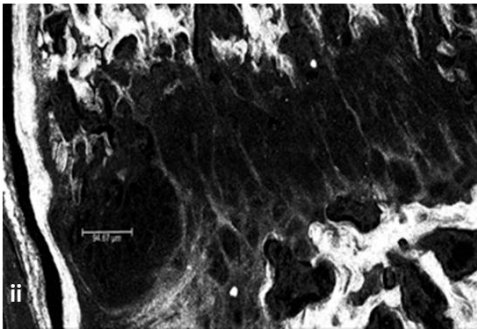
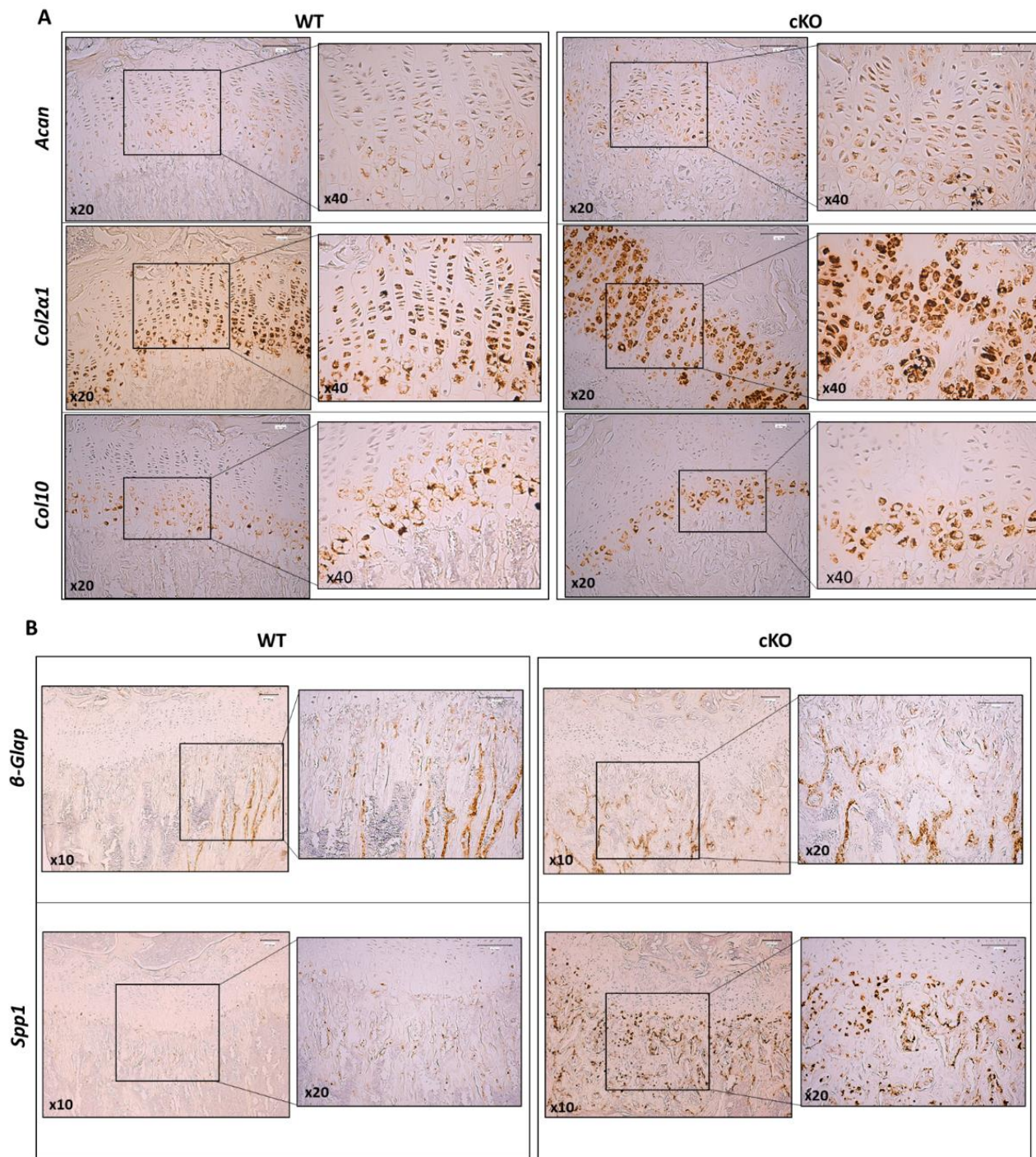
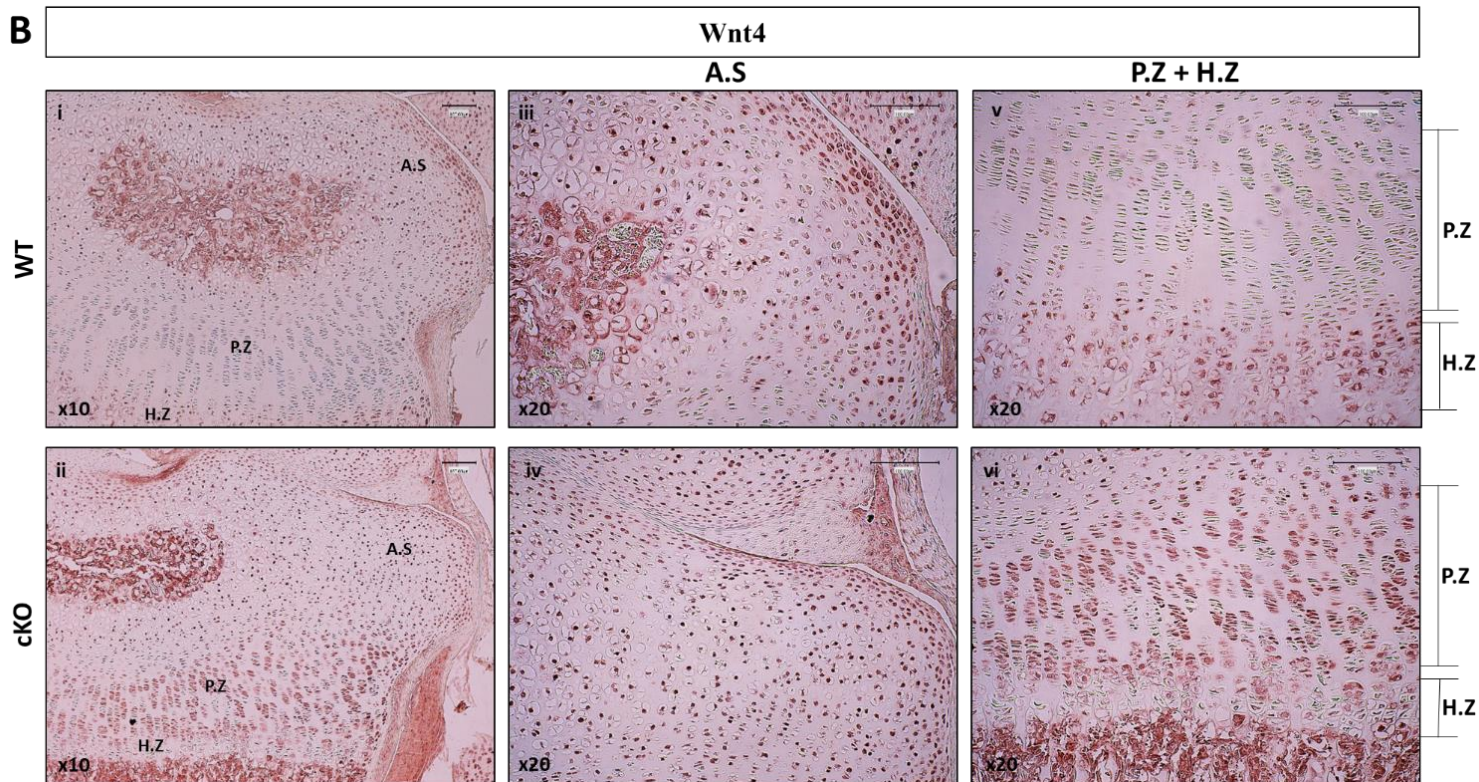
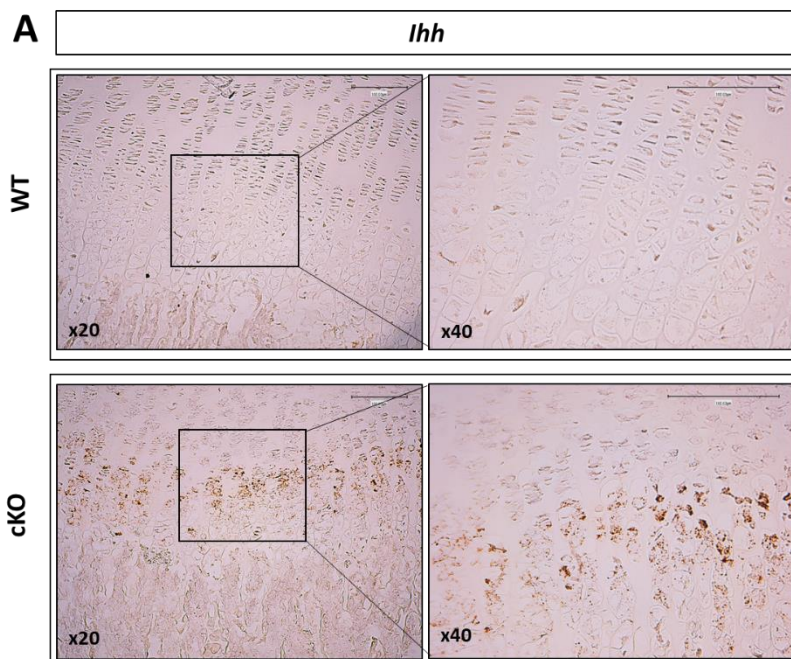
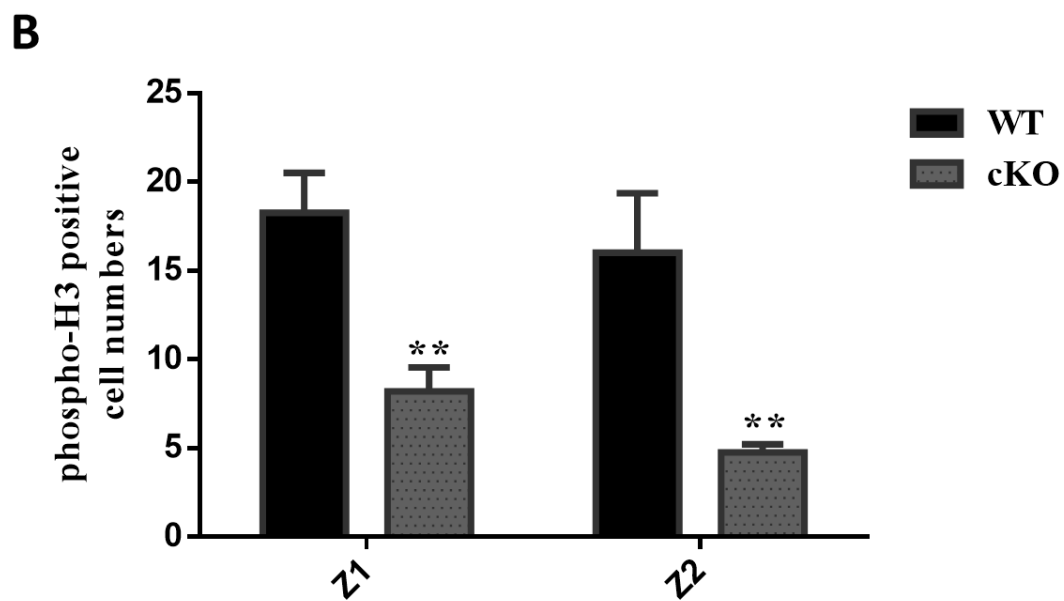
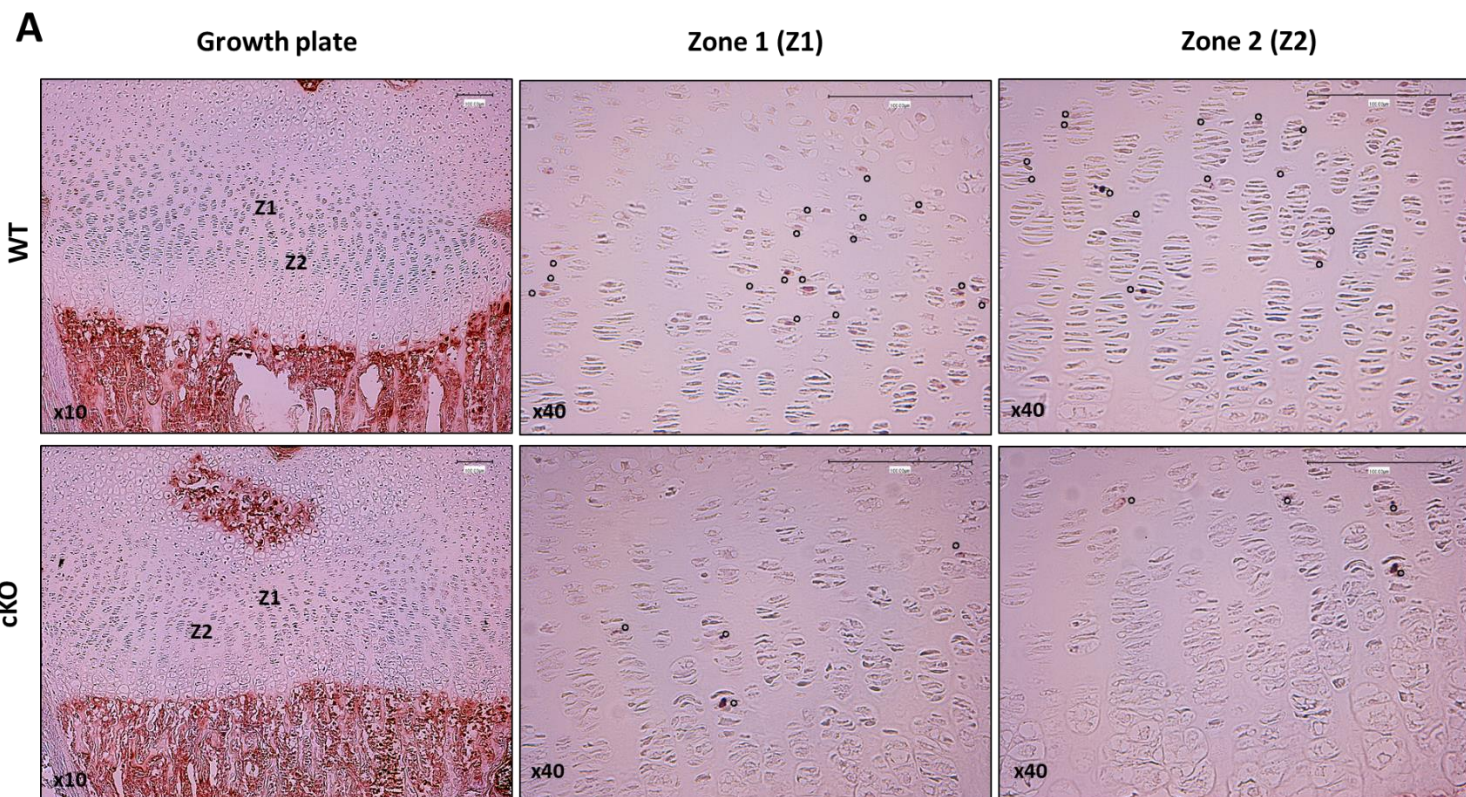
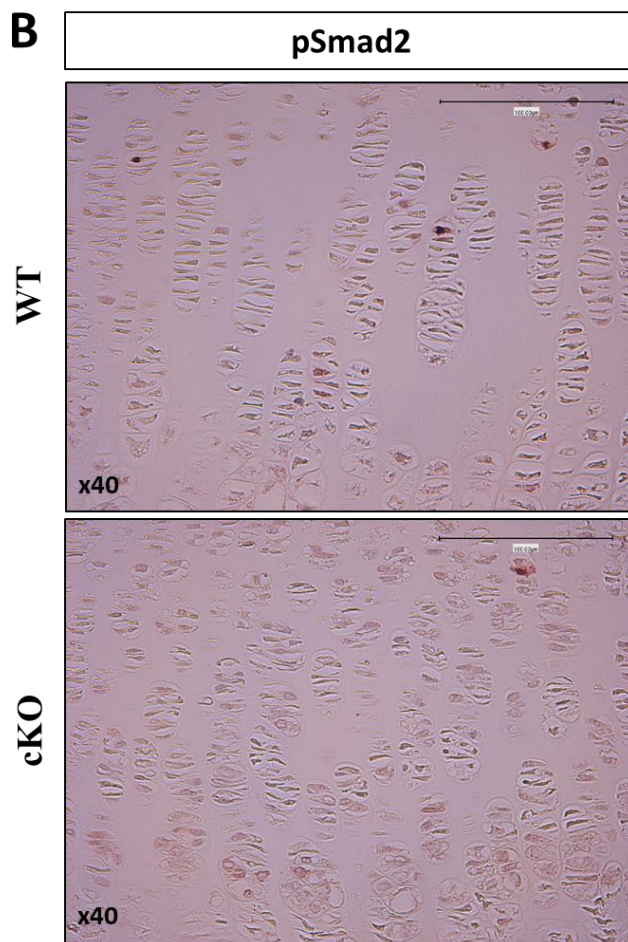
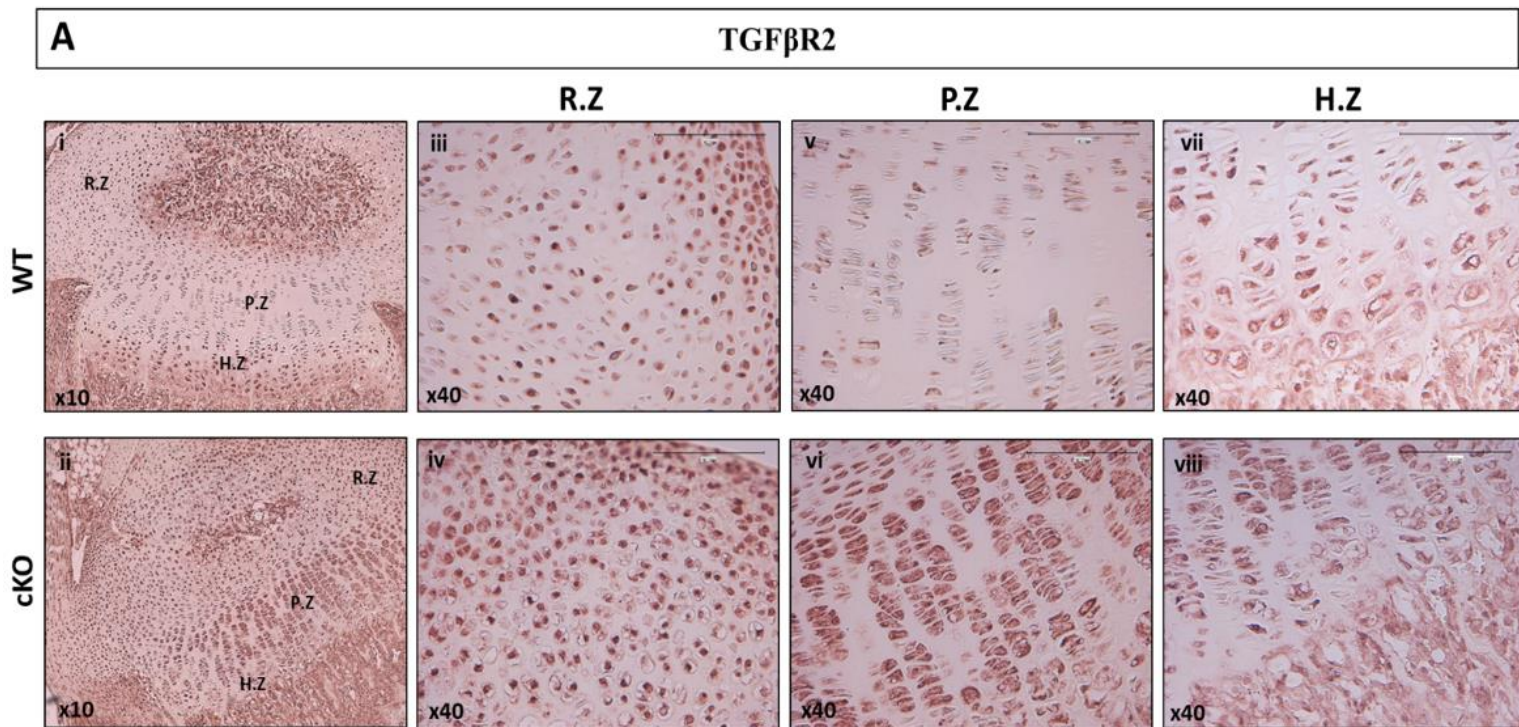


Figure 9

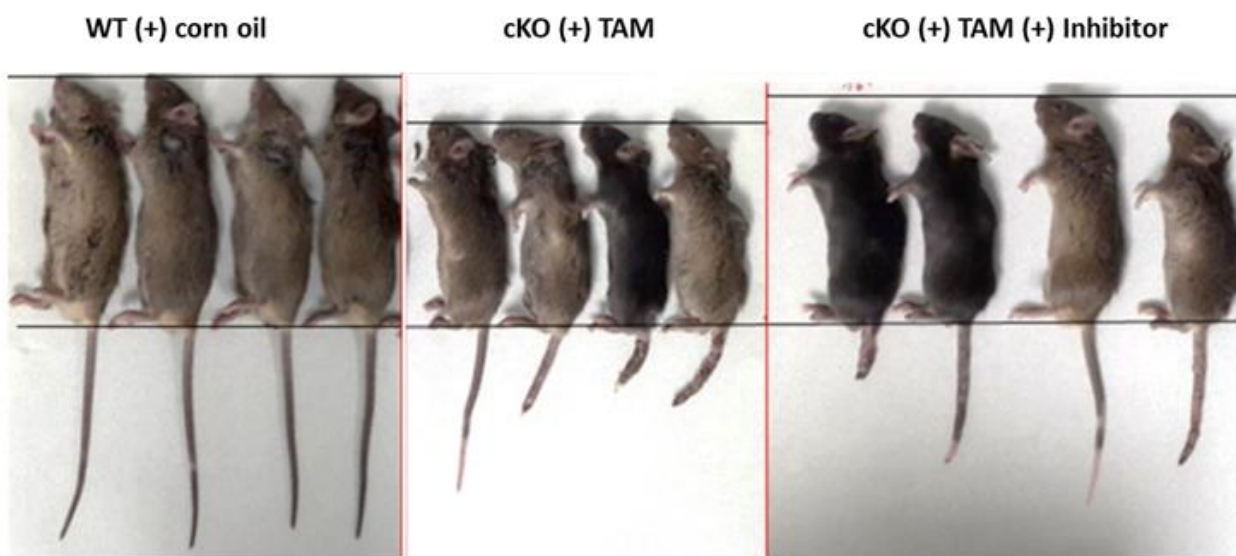




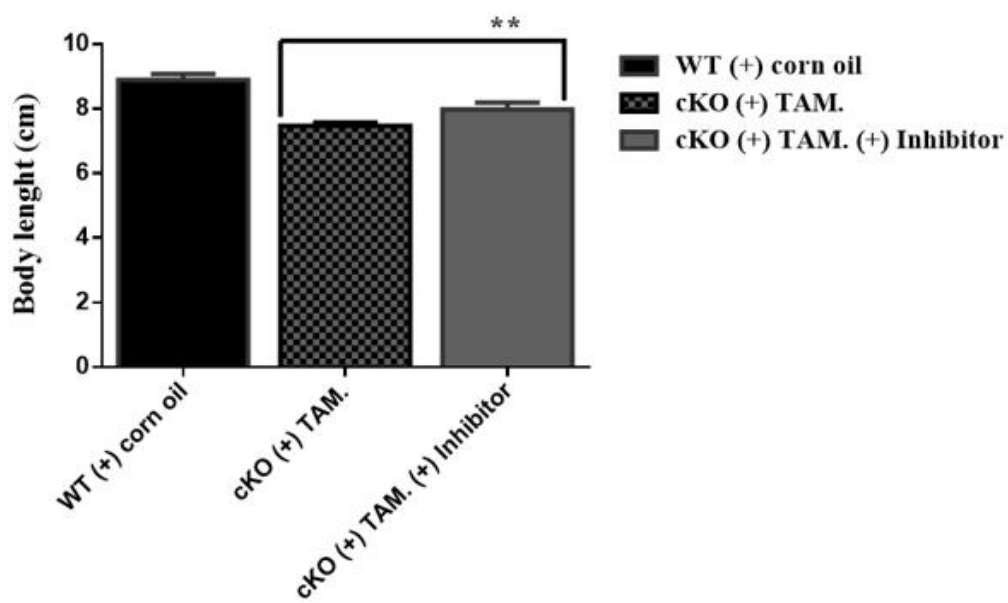


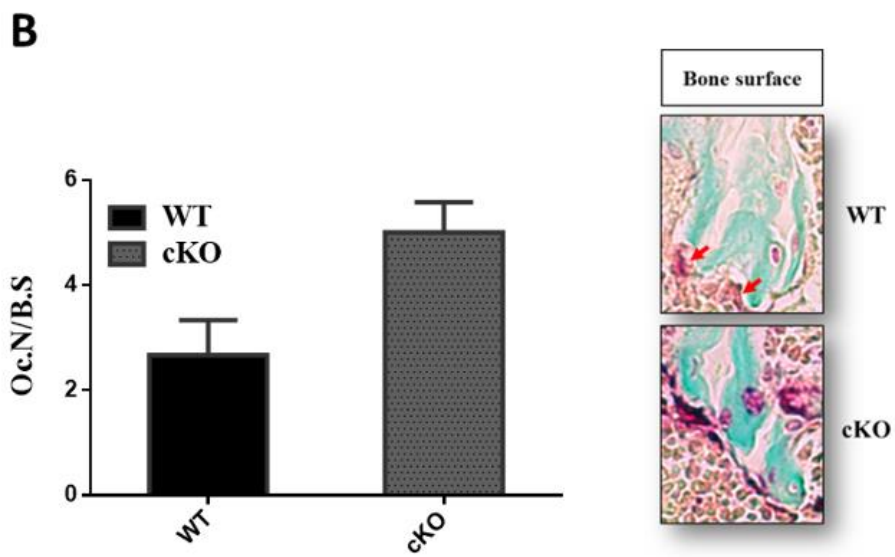
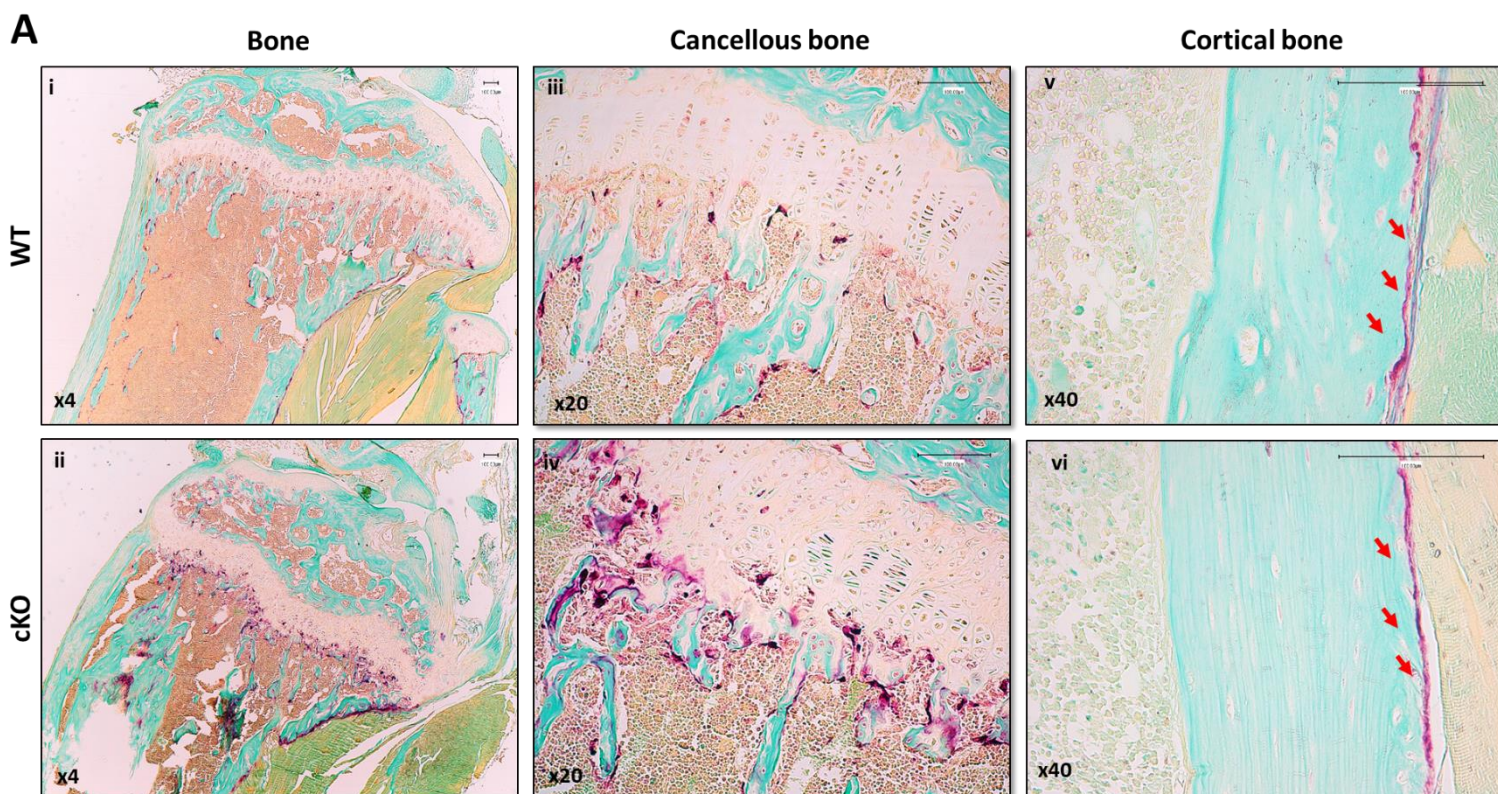


A



B





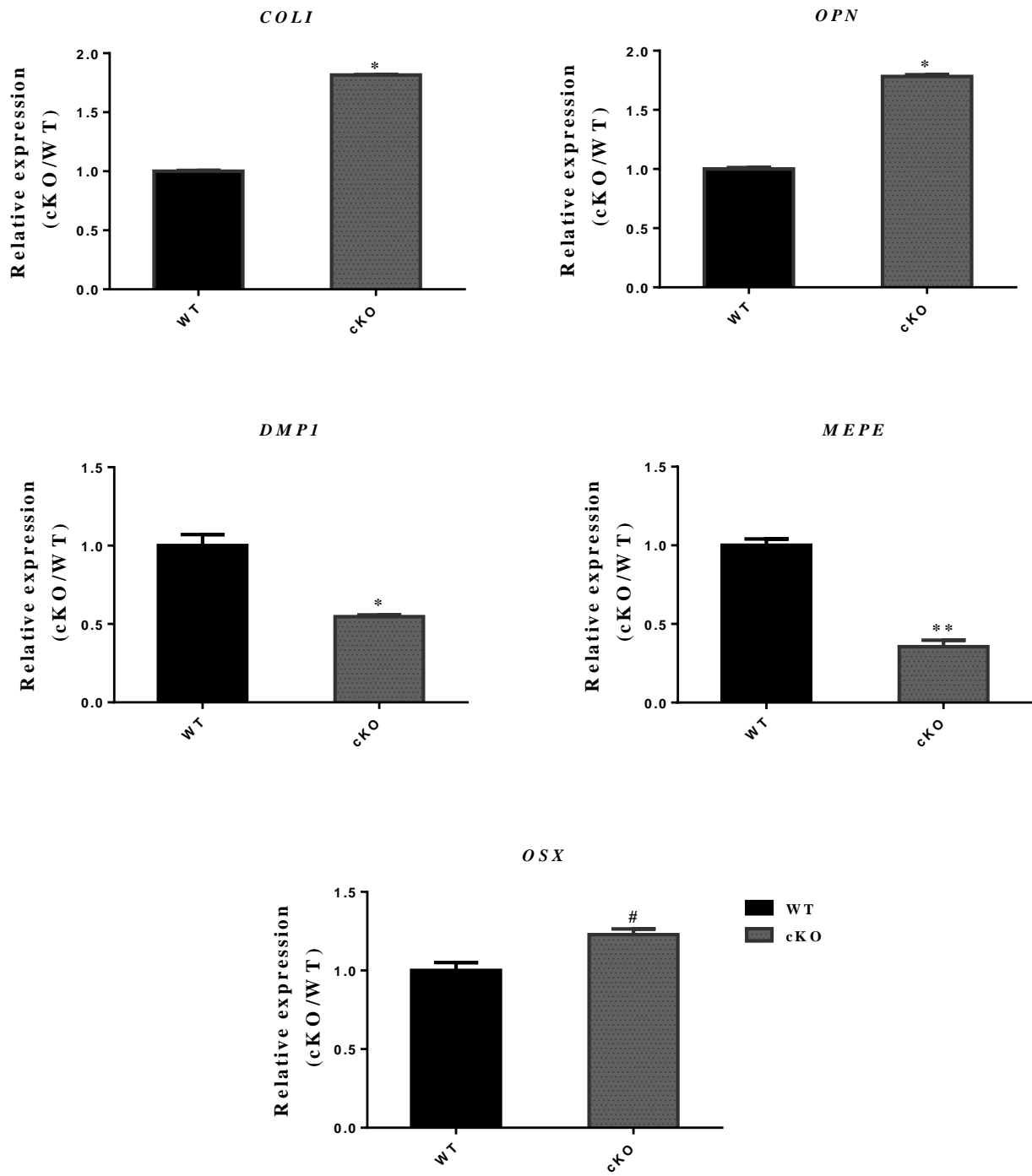


Table Legends

Table 1 Quantitative analysis of dynamic and static histomorphometric parameters in Col2 α 1-CreERTM;XylTI^{flox/flox} femurs mice aged 8-week-old

The values are expressed in mean \pm SD. The analysis was done on N = 6 mice. WT: mice injected with corn oil. cKO: mice injected with tamoxifen.

Bone parameters	Symbols	Unit measures	WT (Average \pm SD)	cKO (Average \pm SD)
Percent bone volume	BV/TV	%	10.68 \pm 1.63	9.38 \pm 0.16
Trabecular thickness	Tb.Th	mm	0.0414 \pm 0.002	0.0529 \pm 0
Trabecular number	Tb.N	1/mm	2.5711 \pm 0.22	1.7713 \pm 0.03
Cortical thickness	Ct.Th	mm	0.2 \pm 0.02	0.23 \pm 0.02
Bone mineral density	BMD	mg/cc	1.0372 \pm 0.0153	1.0013 \pm 0.0028
Tissue mineral density	TMD	mg/cc	1.4069 \pm 0.003	1.4263 \pm 0.0041

Résumé : Les protéoglycanes (PGs) sont des protéines présentes au niveau de la matrice extracellulaire et à la surface des cellules. Ils sont constitués d'une protéine sur laquelle sont attachées des chaînes de glycosaminoglycanes. Ils jouent un rôle essentiel dans plusieurs processus biologiques. Des mutations au niveau des gènes codant pour la protéine porteuse ou les enzymes impliquées dans la biosynthèse des GAGs sont associées à plusieurs syndromes et pathologies chez l'homme. L'initiation de la synthèse des GAGs est catalysée par la xylosyltransférase I (XT-I). La XT-I joue un rôle clé dans la régulation de la synthèse des PGs au niveau du cartilage et il a été montré récemment que les mutations hypomorphiques de la XT-I sont associées au syndrome du Desbuquois de type II (DBQD2) caractérisé par des anomalies squelettiques (ostéochondrodysplasie). Afin d'élucider le rôle de la XT-I dans le développement ostéoarticulaire, nous avons généré une souris transgénique conditionnelle *Col2a1-CreERTM; XylTI^{flox/flox}* permettant l'inactivation de la XT-I au niveau du cartilage. De façon intéressante, l'inactivation de la XT-I induit des anomalies du développement ostéoarticulaire caractérisées par un nanisme important et des défauts des éléments squelettiques. Des études histologiques et la microscopie SHG (génération de seconde harmonique) de la plaque de croissance ont permis de montrer l'importance de la XT-I dans la formation de la matrice extracellulaire (MEC), la fibrillation du collagène II, la maturation des chondrocytes et leur organisation en colonne dans la plaque de croissance. L'analyse des mécanismes moléculaires impliqués indique la perturbation de la voie de signalisation du TGF- β dans la plaque de croissance. D'autre part, des études histomorphométriques et histologiques des os ont révélé que la déficience en XT-I entraîne une accélération du processus d'ossification avec une stimulation de l'activité des ostéoclastes au niveau de l'os spongieux conduisant à une résorption osseuse importante et à une ossification accrue de l'os cortical. Ces travaux ont permis de révéler le rôle de la XT-I dans le développement ostéoarticulaire et dans le maintien de l'homéostasie du cartilage et du tissu osseux et ont mis en évidence le rôle de la voie du TGF- β dans les anomalies du développement. Ces travaux ouvrent également la voie pour le développement de thérapies potentielles pour le traitement des patients atteints du syndrome de Desbuquois type II.

Mots clé : Xylosyltransférase I, Protéoglycanes, Matrice extracellulaire, Chondrocytes, Ostéoblastes, Développement ostéoarticulaire.

Summary: Proteoglycans (PGs) are proteins present in the extracellular matrix and on the surface of cells. They consist of a protein to which chains of glycosaminoglycans (GAGs) are attached. PGs play an essential role in many biological processes and in the homeostasis of different tissues including cartilage, bone and skin. Mutations in the genes encoding PG core proteins or the enzymes involved in GAG biosynthesis are associated with several syndromes and pathologies in human. Initiation of GAG synthesis is catalyzed by xylosyltransferase I (XT-I). XT-I plays a key role in the regulation of the synthesis of PGs in cartilage and it has been shown recently that hypomorphic mutations of XT-I are associated with the Desbuquois syndrome type II (DBQD2), characterized by skeletal abnormalities (osteochondrodysplasia). To elucidate the role of XT-I in skeletal development, we generated a conditional transgenic mouse, *Col2a1-CreERTM; XylTI^{flox/flox}* allowing the inactivation of XT-I gene in the cartilage. Interestingly, the inactivation of XT-I induces skeletal developmental abnormalities characterized by significant dwarfism, and defects in many skeletal elements. Histological studies and SHG microscopy (second harmonic generation) of the growth plate showed the importance of XT-I in extracellular matrix formation, fibrillation of collagen type II, maturation of chondrocytes and their organization in column in the growth plate. The analysis of the molecular mechanisms involved indicates the disruption of the TGF- β signaling pathway in the growth plate. On the other hand, histomorphometric and histological studies of the bones revealed that the XT-I deficiency causes an acceleration of the ossification process with a stimulation of the osteoclasts activity in spongy bone leading to bone resorption, and increased ossification of the cortical bone. This work revealed the role of XT-I in skeletal development and in the maintenance of cartilage and bone homeostasis and highlighted the role of the TGF- β pathway in developmental abnormalities. This work also paves the way for the development of potential therapeutics for the treatment of patients with Desbuquois syndrome type II.

Keywords: Xylosyltransferase I, Proteoglycans, Extracellular matrix, Chondrocytes, Osteoblasts, Skeletal development.