

Thesis, COLLÉGIALITÉ

Auteur : Grisart, Juliane

Promoteur(s) : Sanchez, Christelle

Faculté : Faculté de Médecine

Diplôme : Master en sciences biomédicales, à finalité approfondie

Année académique : 2020-2021

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/12471>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

Etude des fonctions de l'ostéomoduline chez le zebrafish et dans des cultures primaires d'ostéoblastes

Juliane Grisart

Mémoire de recherche en vue de l'obtention du diplôme de
Master en sciences biomédicales, à finalité approfondie

Promotrice : Dr Christelle Sanchez

Université de Liège
Année académique 2020-2021



Abstract

Osteomodulin (OMD) is a proteoglycan of the SLRP (Small leucine-rich repeat proteoglycans) family. This protein is specifically expressed in mineralised tissue. Like other SLRPs, OMD is involved in the organisation of the ECM. Little is known about the functions of OMD and its involvement in the organisation of the bone matrix. The study of osteomodulin takes place in the context of osteoarthritis. Osteoarthritis is a complex disease which is characterised by a large number of phenotypes involving the different elements of a joint such as the articular cartilage, the subchondral bone or the synovium. The underlying molecular mechanisms of this disease are not yet well defined. The expression of OMD is reduced in osteoblasts from osteoarthritis patients and a better understanding of the activity of this protein in bone could therefore help to understand its involvement in bone-driven osteoarthritis. Studies of non-sclerotic osteoblast cultures have shown a slight increase in alkaline phosphatase activity when treated with OMD. The functions of *omd* has also been studied in the zebrafish. The zebrafish model is widely used to study skeletal physiology and pathology. Injection of *omd* mRNA develops significant ventralization and skeletal malformation phenotypes in this model. These results suggest that OMD may regulate the activity of morphogens including BMP2 in the bone and/or cartilage ECM.

Résumé

L'ostéomoduline (OMD) est un protéoglycane de la famille des « small leucine-rich repeat proteoglycans » (SLRPs). Cette protéine est exprimée de manière spécifique dans les tissus minéralisés. Comme les autres SLRPs, l'OMD est impliqué dans l'organisation de la matrice extracellulaire (MEC). Les fonctions de l'OMD et son implication dans l'organisation de la matrice osseuse sont peu connues. L'étude de l'ostéomoduline s'inscrit dans le contexte de l'arthrose. L'arthrose est une maladie complexe qui est caractérisée par un grand nombre de phénotypes impliquant les différents éléments d'une articulation tels que le cartilage articulaire, l'os sous-chondral ou encore la synovie. Les mécanismes moléculaires sous-jacents de cette maladie ne sont pas encore bien définis. L'expression de l'OMD est réduite dans les ostéoblastes de patients arthrosiques et une meilleure compréhension de l'activité de cette protéine dans l'os pourrait donc permettre de comprendre son implication dans l'arthrose. L'étude de cultures d'ostéoblastes non-sclérotiques a permis de montrer une légère augmentation de l'activité de l'alkaline phosphatase lorsque celles-ci sont traitées à l'OMD. L'*omd* a également été étudiée chez le zebrafish. Le modèle de zebrafish est largement utilisé pour étudier la physiologie et la pathologie du squelette. L'injection d'ARNm d'*omd* développe dans ce modèle des phénotypes de ventralisations et de malformations du squelette importantes. Ces résultats suggèrent que l'OMD pourrait être un régulateur de l'activité des morphogènes dont BMP2 au niveau de la MEC osseuse et/ou cartilagineuse.

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidée au cours du stage et dans l'écriture de ce mémoire.

En premier lieu, je voudrais remercier le Professeur Yves Henrotin, directeur de mSKIL pour m'avoir offert la possibilité de faire mon mémoire au sein de son laboratoire de recherche.

Je remercie ma promotrice, le Docteur Christelle Sanchez, pour m'avoir accueillie dans son équipe et avoir supervisé mon travail. J'aimerais également remercier le Docteur Cécile Lambert et Prescilia Centonze pour leur bonne humeur et leur soutien durant ces journées de travail.

J'aimerais remercier, tout spécialement, mon superviseur, Jérémie Zappia pour avoir cru en moi et avoir fait de ce mémoire une expérience enrichissante.

Un grand merci à Tiago Pinto Coelho qui a été un super coéquipier et qui pendant ces quelques mois m'a apporté une aide précieuse.

Je souhaite également remercier l'équipe du GIGA, Laura, Chiara, Marie et les autres pour l'aide apportée et ainsi que pour la bonne ambiance au laboratoire.

Je remercie mes parents, mes sœurs et ma meilleure amie pour leurs encouragements et leurs conseils avisés.

Table des matières

1. Introduction	1
1.1. Les tissus squelettiques	1
1.1.1. Les cellules squelettiques	1
1.1.2. L'os	2
1.1.2.1. Les types d'os	2
1.1.2.2. La composition des os	3
1.1.2.3. L'ossification	3
1.1.2.4. La différenciation osseuse	4
1.1.2.5. Le remodelage osseux	5
1.1.3. Le cartilage	6
1.1.4. Les articulations	7
1.2. Les pathologies squelettiques	7
1.2.1. L'arthrose	7
1.2.1.1. L'épidémiologie	7
1.2.1.2. La pathogénèse	8
1.2.1.3. Le diagnostic	9
1.3. Les "small leucine-rich repeat proteoglycans"	11
1.3.1. L'ostéomoduline	13
1.4. Le modèle zebrafish (Danio rerio)	14
1.4.1. Les zebrafish vs les mammifères	14
1.4.2. Le squelette du zebrafish	14
1.4.2.1. Les articulations synoviales du zebrafish	15
1.4.2.2. Les modèles d'arthrose chez le zebrafish	16
2. Les objectifs et stratégies	17
3. Le matériel et méthodes	19
3.1. Les cultures d'ostéoblastes primaires	19
3.1.1. La quantification de l'ADN	20
3.1.2. L'analyse de l'activité de la phosphatase alcaline	20
3.2. Le zebrafish	20
3.2.1. L'élevage	20
3.2.2. Les lignées de zebrafish	21

3.2.3. L'hybridation <i>in situ</i> de l'omd	22
3.2.3.1. La déshydratation	22
3.2.3.2. L'hybridation <i>in situ</i> colorimétrique	22
3.2.4. La coloration au bleu alcian	24
3.2.5. La coloration au rouge alizarine	24
3.2.6. L'acquisition et l'analyse d'images	25
3.2.7. L'injection d'ARNm	26
3.2.8. La préparation des solutions	26
3.3. Les statistiques	27
4. Les résultats	28
4.1. L'étude de l'ostéomoduline sur les cultures primaires d'ostéoblastes	28
4.1.1. L'étude de l'activité de la phosphatase alcaline des ostéoblastes	28
4.2. L'étude de l'ostéomoduline chez le zebrafish	28
4.2.1. L'étude des zebrafish <i>omd</i> mutants	28
4.2.1.1. La caractérisation de l'expression de l'omd chez le zebrafish	28
4.2.1.2. Les mesures morphométriques du cartilage	30
4.2.1.3. Le scoring de la minéralisation	31
4.2.1.4. L'étude du squelette des zebrafish juvéniles	31
4.2.2. L'étude des zebrafish injectés avec de l'ARNm d' <i>omd</i>	32
4.2.2.1. L'étude de la mortalité et du phénotype ventralisé à 1 jour après l'injection	33
4.2.2.2. L'étude des larves malformées de 4 jours	34
4.2.2.3. Les mesures morphométriques du cartilage sur les larves de 5 jours	34
4.2.2.4. Le scoring de la minéralisation sur les larves de 5 jours	35
5. La discussion	36
5.1. L'étude de l'ostéomoduline sur les cultures primaires d'ostéoblastes	36
5.2. L'étude de l'ostéomoduline chez le zebrafish	36
5.2.1. L'étude des zebrafish <i>omd</i> mutants et étude du squelette des zebrafish juvéniles	37
5.2.2. L'étude des zebrafish injectés avec de l'ARNm d' <i>omd</i>	40
5.3. La connexion entre les différentes observations	41
6. La conclusion	43
7. La bibliographie	45

Liste des abréviations

ADAMTS = « A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs »

BMP = « Bone Morphogenetic Protein »

cdh17 = « Cadhérine 17 »

DIG = Digoxigénine

DMEM = « Dulbecco's modified Eagle's medium »

dpf = « day post-fertilization » = jour post-fertilisation

FBS = «foetal bovine serum»

GAG = glycosaminoglycanes

Gln = glutamine

HEPES = acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazineéthanesulfonique

hpf = « hour post-fertilization » = heure post-fertilisation

IFN- β = Interféron-beta

IRM = Imagerie par résonance magnétique

LRR = Répétitions riches en leucine

MAPK = « Mitogen-activated protein kinases »

MEC = Matrice extracellulaire

MetOH = Méthanol

MMP = Métalloprotéinase matricielle

Msx2 = « Msh homeobox 2 »

NFKB = « Nuclear factor-kappa B »

NSC = Non-sclérotique

OARSI = «Osteoarthritis Research Society International »

OMD/*omd* = Ostéomoduline (gène humain/gène zebrafish)

OPG = Ostéoprotégérine

PAL = Phosphatase alcaline

PBS = « Phosphate-buffered saline » = Tampon phosphate salin

PFA = Paraformaldéhyde

PS = Pénicilline et Streptomycine

PTU = 1-phenyl 2-thiourea

RANK = Récepteur activateur du facteur nucléaire kappa-B

RANKL = Récepteur activateur du ligand du facteur nucléaire kappa-B

rhOMD = Ostéomoduline recombinante humaine

Runx-2 = « Runt-related transcription factor 2 »

SC = Sclérotique

SLRPs = « Small leucine-rich repeat proteoglycans »

SSC = « Saline-sodium citrate buffer »

TA = Température ambiante

TGF- β = « Transforming growth factor- β »

UG = UltrosérG

VEGF = « Vascular endothelial growth factor » = facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

WT = « Wild Type » = sauvage

+/+ = Homozygote WT

-/- = Homozygote mutant

1. Introduction

1.1. Les tissus squelettiques

Le squelette est un organe complexe avec des processus dynamiques de dépôt et de résorption osseuse ¹. Ces processus permettent le maintien de la masse osseuse et le renouvellement de l'os. Le squelette est composé de deux principaux types de tissus : le cartilage et l'os ². Les nombreux os présents dans le squelette sont soutenus et maintenus par des ligaments, des tendons, des muscles et des fascias. Le squelette assure un large éventail de fonctions comme la locomotion, le support de l'hématopoïèse dans la moelle osseuse ou encore le réservoir de minéraux en particulier le calcium ¹.

1.1.1. Les cellules squelettiques

Les chondrocytes, les ostéoblastes et les ostéoclastes sont les principales cellules présentes dans le squelette. Les chondrocytes et les ostéoblastes dérivent des cellules mésenchymateuses tandis que les ostéoclastes sont issus de la lignée des monocytes/macrophages.

Les ostéoblastes jouent un rôle majeur dans la formation osseuse en produisant la plupart des protéines qui constituent la matrice osseuse. Ils sont responsables de la minéralisation par le dépôt de cristaux de phosphate de calcium et régulent l'activité des ostéoclastes ^{1,3}. La formation et le remodelage du tissu osseux sont régulés par des facteurs tels que l'ostéocalcine, l'ostéonectine, la métalloprotéinase matricielle 13 (MMP13), le récepteur activateur du ligand du facteur nucléaire kappa-B (RANKL) et l'ostéoprotégérine (OPG), qui sont produits par les ostéoblastes¹.

Les ostéoblastes et les chondrocytes sont considérés comme des cellules formatrices de l'os, tandis que les ostéoclastes sont considérés comme des cellules résorbantes de l'os ². L'activation des précurseurs des ostéoclastes induit la formation de cellules géantes multinucléées capables de résorber la matrice osseuse via des lacunes de résorption. Ces cellules sont les ostéoclastes matures. Enfin, les ostéocytes sont des cellules dérivant des ostéoblastes. Ces cellules sont entourées de matrice osseuse minéralisée au contraire des ostéoblastes qui bordent cette matrice. Les ostéocytes possèdent des extensions

cytoplasmiques permettant le contact avec d'autres cellules via les canalicules des os ⁴. Malgré le phénotype quiescent de ces cellules, elles jouent un rôle important dans la régulation de l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes grâce à la sécrétion de cytokines et d'autres facteurs^{4,5}.

1.1.2. L'os

1.1.2.1. Les types d'os

Les os longs, les os courts, les os plats et les os irréguliers sont les différents types d'os du squelette humain. La majorité des os longs se trouvent dans les membres alors que les os courts se trouvent généralement dans le poignet et la cheville. Quant aux os plats, ils composent principalement le crâne.

Dans les os, on retrouve deux classes principales de tissus ; les os corticaux et trabéculaires. Les os corticaux constituent la couche externe qui est blanche, lisse et compacte. Alors que les os trabéculaires, également appelés os spongieux, forment la couche interne de l'os qui est poreuse et moins dense. Les os trabéculaires contiennent notamment les cellules souches hématopoïétiques et sont entourés d'os cortical. Ces classes d'os ont des propriétés physiques différentes. L'os compact offre une résistance à la flexion et à la torsion tandis que l'os trabéculaire offre une résistance aux contraintes physiques, la faible densité de l'os trabéculaire permet quant à elle une bonne résistance à la compression.

Les os peuvent également être classés en fonction de leur structure et de leur stade de maturation comme suit : os réticulaire et os laminaire.

L'os réticulaire est le premier os qui se développe pendant l'embryogenèse ou lors d'une grosse réparation osseuse. L'organisation du collagène est aléatoire et la minéralisation est irrégulière et incomplète.

L'os lamellaire est séparé en deux groupes l'os lamellaire haversien et non haversien. L'os lamellaire haversien est composées de lamelles osseuses disposées concentriquement autour des canaux de Havers pour former l'os diaphysaire. L'os lamellaire non haversien fait quant à lui la jonction entre le périoste et l'os lamellaire haversien dans la diaphyse.

1.1.2.2. La composition des os

Les os sont composés de différents éléments tels que les cellules, la matrice minéralisée, la matrice organique, les lipides et les glycosaminoglycanes (GAG). Les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes sont les principales cellules contenues dans les os. La matrice minéralisée contient des cristaux d'hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) et une large gamme de minéraux (Carbonate, citrate, fluorure, chlorure, sodium, magnésium, potassium, strontium). La matrice organique contient quant à elle principalement du collagène de type I et secondairement d'autres protéines comme l'ostéocalcine, l'ostéonectine, des phosphoprotéines ou encore des « small leucine-rich repeat proteoglycans » (SLRPs)^{3,6,7}.

Un tissu conjonctif entoure les os longs et plats à l'exception des régions articulaires, le périoste. Ce tissu est composé d'une couche interne et d'une couche externe. La couche interne contient des cellules précurseurs d'ostéoblastes ou de chondrocytes. La couche externe est une couche conjonctive recouvrant l'os et la capsule articulaire. Le périoste permet l'insertion des ligaments et des tendons. Le périoste n'est donc pas du tissu osseux à proprement dit mais permet le développement en largeur des os grâce aux précurseurs ostéoblastiques qu'il contient.

1.1.2.3. L'ossification

L'ossification endochondrale et intramembranaire sont deux types d'ossification qui participent au développement des os.

L'ossification intramembranaire est un processus de formation osseuse où les cellules mésenchymateuses se différencient directement en ostéoblastes^{1,2,8}. Les os plats du crâne sont notamment formés grâce à ce processus.

Les os longs et la plupart des autres os sont formés grâce à l'ossification endochondrale. L'ossification endochondrale est un processus de formation osseuse qui inclut une base de cartilage⁷. Dans ce processus, les cellules mésenchymateuses se différencient en chondrocytes pour former la matrice cartilagineuse qui sera remplacée par la suite par du tissu osseux. L'ossification endochondrale commence dans la diaphyse de l'os, c'est le centre

primaire d'ossification. La première étape est la transformation du périchondre en périoste. Cette modification induit l'hypertrophie des chondrocytes de la matrice cartilagineuse. Cette hypertrophie va alors laisser un vide qui est rapidement comblé par de la matrice cartilagineuse qui va se calcifier et être néo-vascularisé. Les chondroclastes vont alors pouvoir creuser des cavités dans le cartilage calcifié qui vont être remplies de matrice ostéoïde (matrice osseuse non minéralisée) par les ostéoblastes. Les ostéoclastes vont alors pouvoir façonner l'os trabéculaire. Ensuite, il y a le développement des centres secondaires d'ossification dans les épiphyses où un processus similaire d'ossification se produit. L'ostéoïde va finalement être minéralisé⁹.

Entre le centre primaire et le centre secondaire d'ossification se trouve la plaque épiphysaire qui est un cartilage permettant la croissance de l'os jusqu'à ce que la taille adulte soit atteinte.

1.1.2.4. La différenciation osseuse

Au cours de la différenciation ostéoblastique, différents marqueurs moléculaires peuvent être mis en évidence en fonction du stade d'avancement. Le collagène de type I et la phosphatase alcaline (PAL) sont des marqueurs moléculaires pour le stade précoce de la différenciation ostéoblastique¹. La PAL est une enzyme qui hydrolyse le pyrophosphate en phosphate inorganique favorisant la minéralisation^{7,10}. L'étude de cette enzyme permet notamment d'obtenir un reflet de l'activité des ostéoblastes. L'ostéocalcine et la minéralisation de la matrice extracellulaire (MEC) sont eux des marqueurs moléculaires du stade avancé de la différenciation ostéoblastique. L'ostéonectine, l'ostéopontine et la sialoprotéine osseuse sont également des marqueurs osseux qui sont exprimés à différents stades de différenciation et jouent tous un rôle dans la minéralisation et plus spécifiquement dans la formation et l'interaction avec les cristaux d'hydroxyapatite¹. L'ostéopontine est une sialoprotéine présente dans la matrice minéralisée des os et des dents. Cette protéine assure la liaison entre les cellules osseuses et les cristaux d'hydroxyapatite¹¹. L'ostéocalcine est produite par les ostéoblastes et se lie à l'hydroxyapatite grâce à une modification post-transcriptionnelle. Cette protéine non collagénique est un marqueur de la formation osseuse et semble également jouer un rôle hormonal dans la régulation de la sensibilité à l'insuline⁵. L'ostéonectine est également une protéine non collagénique abondante présente dans la matrice osseuse minéralisée qui lie le collagène aux cristaux d'hydroxyapatite.

Runx-2 (« Runt-related transcription factor 2 ») et sp7 (Osterix) sont deux gènes fortement impliqués dans la différenciation des ostéoblastes^{2,3,12}. Runx-2 permet la différenciation des cellules mésenchymateuses en pré-ostéoblastes. Les pré-ostéoblastes se différencient en ostéoblastes grâce à l'expression de sp7 au stade précoce de la différenciation¹. L'expression de ce gène est réduite au stade tardif, son effet est dépendant du stade de différenciation puisque son expression inhibe la différenciation des ostéoblastes^{3,13}. RANKL, c-Fos et NFκB (« Nuclear factor-kappa B ») sont eux des gènes impliqués dans la différenciation des ostéoclastes. L'interaction RANK/RANKL est essentielle à l'activation des ostéoclastes. RANKL se trouve dans la membrane des ostéoblastes ou est sécrété par ces cellules³. L'interaction avec RANK (Récepteur activateur du facteur nucléaire kappa-B) situé sur les ostéoclastes active la voie c-Fos. c-Fos régule à la hausse plusieurs gènes d'ostéoclastes matures et favorise la sécrétion de l'interféron-β (IFN-β). L'IFN-β inhibe la voie c-Fos dans les précurseurs des ostéoclastes autour, empêchant ainsi la différenciation des ostéoclastes.

La voie BMP (Bone Morphogenetic Protein) est une voie qui fait partie de la cascade biologique permettant de produire le tissu osseux fonctionnel. Un grand nombre de ligands des BMPs permettent d'assurer les activités cellulaires de cette voie au sein de la matrice osseuse. Les BMPs font partie d'une plus grande famille appelée TGF-β (transforming growth factor-β)¹⁴. Les protéines de cette famille agissent sur des récepteurs induisant l'activation de la voie Smad ou MAPK (« Mitogen-activated protein kinases »). Ces voies sont impliquées dans le développement de l'os mais permettant également le maintien de l'os et du cartilage. Les différentes voies impliquées vont permettre de jouer un rôle essentiel dans la régulation de l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes. TGF-β a une action dose dépendante, où une faible expression de ce facteur va promouvoir la différenciation ostéoclastique alors qu'une forte expression inhibe cette différenciation. Les BMPs vont notamment permettre l'activation de la voie Smad au cours du développement et activer l'expression du gène Runx-2 nécessaire à l'ostéogenèse qui active lui-même l'expression du facteur de transcription sp7^{15,16}.

1.1.2.5. Le remodelage osseux

Les tissus osseux subissent constamment un remodelage qui est un équilibre entre la formation et la résorption osseuse. La résorption est réalisée par les ostéoclastes, les ostéoblastes forment l'ostéoïde et participent à sa minéralisation.

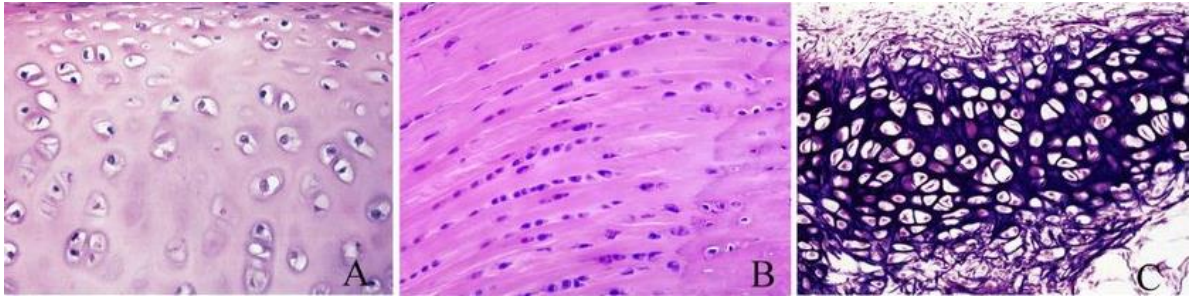


Figure 1 Différents types de cartilage. A) Cartilage hyalin ; B) Cartilage fibreux ; C) Cartilage élastique. Images adaptées de <http://medcell.med.yale.edu>

L'OPG est un important régulateur du remodelage osseux, de l'ostéoclastogenèse et de l'activation des ostéoclastes³. L'OPG est une protéine soluble produite par les ostéoblastes¹ qui entre en compétition avec RANK en se liant à RANKL. Une concentration élevée d'OPG diminue la disponibilité de RANKL et favorise l'augmentation de la masse osseuse, tandis qu'une faible concentration d'OPG favorise la résorption osseuse et la diminution de la masse osseuse².

L'expression de RANKL et d'OPG est régulée par diverses hormones telles que la parathormone (PTH), la vitamine D, la calcitonine, les œstrogènes, la sérotonine et la leptine^{1,3}. Par exemple, la leptine inhibe la formation osseuse et les œstrogènes régulent le remodelage osseux. Pendant la ménopause, on peut par exemple observer une diminution des œstrogènes qui induit une perte osseuse².

Le remodelage osseux est un phénomène complexe régulé par un grand nombre d'acteurs.

1.1.3. Le cartilage

Le cartilage est un tissu conjonctif présent à différents endroits du squelette. Le cartilage articulaire permet de protéger l'os et facilite le mouvement en limitant les frottements. Ce cartilage a la particularité d'être flexible et en même temps résistant. Le cartilage n'est ni vascularisé, ni innervé ce qui rend son renouvellement très lent voir nul. Le cartilage de croissance est quant à lui présent dans les os permettant la croissance de l'os jusqu'à l'âge adulte.

Le cartilage est composé de cellules, d'eau et de matrice organique. Les cellules présentes dans le cartilage sont les chondroblastes et les chondrocytes. Le collagène de type II et les protéoglycanes sont les principaux composants de la matrice organique qui contient également quelques autres protéines¹.

Différents types de cartilage peuvent être classés selon leur structure et leur composition en collagènes et en protéoglycanes. Cette classification se subdivise en trois : le cartilage élastique, le cartilage fibreux et le cartilage hyalin¹⁷ (Fig. 1).

1.1.4. Les articulations

Les articulations sont des parties complexes du squelette qui permettent les mouvements ⁸. Les articulations sont composées de ligaments, de tendons, de cartilage et d'os pour assurer cette fonction. Deux types d'articulations existent dans le squelette humain, les articulations non synoviales (articulations synarthrodiales) et les articulations synoviales (articulations diarthrodiales). Les articulations synoviales sont entourées d'une capsule synoviale à l'extrémité des os ^{8,18,19}. Les synoviocytes présents dans l'articulation produisent des lubrifiants comme l'acide hyaluronique et la lubricine qui sont des constituants du liquide synovial lubrifiant. Ce liquide permet de limiter les frottements au sein de l'articulation ¹⁹.

1.2. Les pathologies squelettiques

Le squelette est un organe complexe qui fait intervenir de nombreux processus. Une altération de ces processus peut conduire à différentes pathologies squelettiques. Parmi ces pathologies, certaines affectent l'appareil locomoteur, on les appelle les maladies rhumatismales. Cette catégorie regroupe de nombreuses maladies affectant les articulations, les tendons ou les os comme par exemple la polyarthrite rhumatoïde, la goutte ou encore l'arthrose.

1.2.1. L'arthrose

L'arthrose est une maladie articulaire fortement corrélée au vieillissement ^{8,20}. La dégénérescence et la perte du cartilage, l'inflammation synoviale, l'altération de l'os périarticulaire avec la formation d'ostéophytes et la sclérose de l'os sous-chondral sont les phénotypes que l'on retrouve dans les articulations arthrosiques. L'arthrose est généralement présentes dans les genoux, les hanches ou les mains ^{3,20}.

La douleur et la perte de fonction des articulations peuvent être très contraignantes. Le traitement principal de cette maladie consiste à gérer la douleur et pour les stades avancés la chirurgie de remplacement de l'articulation est pratiquée. Néanmoins, les prothèses ont une durée de vie limitée et la chirurgie comporte des risques importants ⁶.

1.2.1.1. L'épidémiologie

L'arthrose est une maladie multifactorielle avec de nombreux facteurs de risque ²¹. Les femmes sont plus touchées que les hommes, l'expression différente d'œstrogènes pourrait jouer un rôle dans ce phénomène. 18% des femmes contre près de 10% des hommes souffrent

d'arthrose après 60 ans ^{6,20,21}. La biomécanique articulaire montre une forte association avec l'arthrose, mais cependant la plupart des individus ayant une mauvaise biomécanique articulaire ne développent pas d'arthrose. Dans les facteurs de risque il y a aussi les blessures qui peuvent rendre le cartilage plus sensible. L'obésité est également un facteur de risque, en augmentant la charge à supporter par les articulations et en augmentant le niveau d'adipokines inflammatoires ^{6,20}. La génétique semble aussi jouer un rôle dans l'arthrose, bien que l'ampleur de l'effet et les implications biologiques restent flous. La prévalence élevée de l'arthrose rend en effet difficile une analyse précise de la contribution génétique.

1.2.1.2. La pathogénèse

La pathogénèse de l'arthrose n'est pas clairement définie. Elle est particulièrement complexe car on peut distinguer de nombreux phénotypes cliniques, en relation avec une origine différente de la pathologie chez les patients (Fig. 2). Le cartilage, l'os sous-chondral et la synovie semblent avoir chacun un rôle clé dans cette maladie ⁶. La dégradation du cartilage

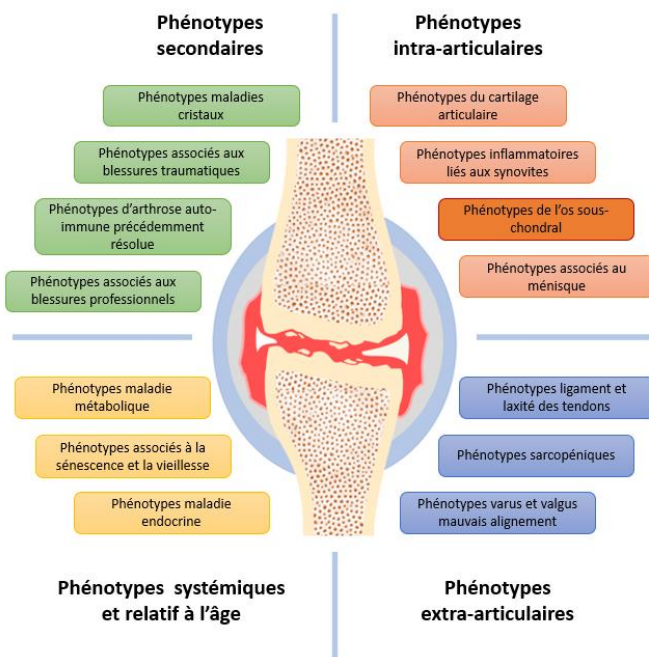


Figure 2 Divers phénotypes cliniques de l'arthrose, adapté de Ali Mobasheri et al. (2019)

articulaire, la formation d'ostéophytes, la sclérose sous-chondrale, la dégénérescence méniscale, les lésions de la moelle osseuse et la prolifération synoviale sont des éléments caractéristiques de l'arthrose.²² Différents systèmes de gradation ont été développés pour classer les phénotypes macroscopiques de l'arthrose du stade précoce au stade le plus avancé. Par exemple, le système de Collins utilise des descriptions de la texture de la surface du cartilage, de la taille des lésions et des changements

osseux pour définir les grades de I à IV. Plus récemment, le système de score OARSI (« Osteoarthritis Research Society International ») a été développé pour standardiser l'évaluation de l'arthrose en estimant l'avancement de la détérioration du cartilage articulaire. Le score OARSI standardisé permet de définir des sous-ensembles particuliers de patients,

ainsi que des critères d'évaluation communs dans les études cliniques et dans le développement de modèles animaux ²³.

L'arthrose est également caractérisée par divers phénotypes cliniques dont ceux repris dans la figure 2 ²². Ces phénotypes sont les conséquences de modifications moléculaires antérieures qui correspondent à divers endotypes moléculaires de l'arthrose. Un endotype est défini comme une voie moléculaire spécifique d'un phénotype²².

Un phénotype macroscopique est en général causé par plusieurs endotypes. L'identification de ces altérations moléculaires dans l'arthrose pourrait permettre de déterminer des expressions différentielles de biomarqueurs et de définir des sous-groupes de patients. Les patients pourront alors recevoir un traitement plus adapté aux caractéristiques spécifiques de leur arthrose.

L'arthrose est une maladie complexe qui possède des profils d'endotypes différents, présentant des altérations moléculaires dans l'entièreté de l'articulation. Ce travail se concentre sur les modifications impliquant l'os sous-chondral.

1.2.1.2.1. L'os sous-chondral dans l'arthrose

L'os sous-chondral est la couche située à l'interface entre le cartilage calcifié et l'os trabéculaire sous-jacent. Les ostéophytes et les kystes sous-chondraux se développent chez les patients atteints par l'arthrose. La modification des propriétés mécaniques de l'os sous-chondral peut agir directement sur le cartilage et provoquer des effets indésirables altérant le cartilage ⁶. Cependant, on ne sait toujours pas qui des modifications de l'os sous-chondral ou de l'altération du cartilage précède l'autre. Une altération du système OPG/RANK/RANKL est également observée dans l'arthrose et semble être en corrélation avec l'altération de l'os sous-chondral ³.

L'os sous-chondral est fortement innervé, ce qui génère probablement les douleurs causées dans l'arthrose lorsqu'il est altéré ⁶.

Le remodelage osseux et la minéralisation de l'os sous-chondral sont également altérés. Dans l'arthrose précoce, on observe une augmentation du remodelage osseux, alors que dans l'arthrose tardive, la résorption osseuse diminue et la formation osseuse augmente ^{3,24}. De nombreuses modifications de l'expression des gènes des ostéoblastes sont observées dans l'arthrose.

Le remodelage osseux anormal et la diminution de la minéralisation entraînent une altération de la microarchitecture osseuse. Les ostéoblastes sont mécano-sensibles et réagissent aux changements en produisant des cytokines inflammatoires et des enzymes de dégradation ⁶. Un niveau anormalement élevé de production de MMP par les ostéoblastes de l'os sous-chondral pourrait entraîner la dégradation du cartilage. Par exemple, la MMP13 peut dégrader l'opticine qui est associée à la MEC et joue un rôle dans la stabilité structurelle du cartilage ³. Une organisation anormale de la matrice osseuse est également présente dans l'arthrose. L'augmentation du TGF- β dans les ostéoblastes chez les patients arthrosiques provoque le développement et la minéralisation des ostéophytes ce qui cause probablement la minéralisation anormale de l'os. Des modifications du métabolisme des ostéoblastes pourraient être à l'origine de ces phénotypes et de la diminution de la quantité de minéraux.

Un grand nombre d'expressions de gènes sont dérégulées, en particulier dans la voie Wnt/ β caténine. Ces altérations telles que l'augmentation de la production de leptine, de phosphatase alcaline, d'ostéocalcine ou de VEGF (« Vascular endothelial growth factor », facteur de croissance de l'endothélium vasculaire), peuvent être dues à une réponse anormale à des facteurs systémiques ou locaux ³.

1.2.1.3. Le diagnostic

Le diagnostic clinique des patients arthrosiques est difficile car seuls les patients présentant des symptômes sont diagnostiqués. Un diagnostic tardif de ces patients peut alors impliquer une arthrose plus avancée et probablement irréversible. En effet, les arthroses précoces sont peu associées aux symptômes. De plus les symptômes ne sont pas de bons indicateurs des caractéristiques structurelles de l'arthrose, comme la perte de cartilage et l'inflammation. Les fluctuations des symptômes dans le temps sont également contraignantes pour diagnostiquer l'arthrose précocement. Même si la séquence des événements à l'origine de l'arthrose n'est toujours pas claire, les changements dans la synovie et la dégénérescence des os et des cartilages semblent être des caractéristiques communes à tous les types d'arthroses. Le diagnostic est un élément important pour les patients souffrant d'arthrose. Obtenir un diagnostic au plus tôt permet des interventions plus précoces qui ont plus de chances de réussir et facilite les mesures de l'efficacité d'un traitement. Une meilleure compréhension

des constituants de la matrice pourrait permettre de déterminer l'intérêt clinique de certains biomarqueurs et la découverte de cible thérapeutique. La découverte de biomarqueur traduisant le développement précoce de l'arthrose permettrait de poser un diagnostic avant même l'apparition des premiers symptômes ^{6,19,21,25}.

1.2.1.3.1. L'imagerie

Les patients symptomatiques sont généralement diagnostiqués par radiographie standard. Des systèmes de cotation comme l'OARSI sont utilisés pour classer l'arthrose ²³. Cette classification comprend l'étude de l'aspect des surfaces, l'observation de la formation d'ostéophytes, de la sclérose sous-chondrale et le développement des fissures ^{21,23}. Le rétrécissement de la largeur de l'espace articulaire semble également être un bon indicateur de la présence d'arthrose. Cependant une procédure standardisée doit être établie car la largeur de l'espace articulaire dépend du positionnement de l'articulation. Cette stratégie ne permet pas de détecter les lésions localisées du cartilage et ne peut donc pas permettre de diagnostiquer une arthrose précoce. La radiographie a tout de même l'avantage d'être peu coûteuse et est largement utilisée. L'imagerie à résonance magnétique (IRM) peut également être utilisée pour diagnostiquer l'arthrose. L'IRM permet d'évaluer les structures articulaires en 3D à haute résolution. Cette technique plus sensible permet de détecter des changements structurels plus précoces. L'utilisation de l'IRM physiologique permet d'évaluer la composition biochimique des tissus. Par exemple, l'IRM à gadolinium retardé évalue le contenu en GAG du cartilage. Ce test est en bonne corrélation avec le grade histologique de l'arthrose. Malheureusement, il prend du temps et nécessite un agent de contraste néphrotoxique. Des techniques alternatives comme le T2 mapping ne nécessitant pas d'agent de contraste et qui ont des temps de balayage acceptables existent, mais ces techniques nécessitent une validation supplémentaire avant d'être utilisées en routine ⁶.

1.3. Les “small leucine-rich repeat proteoglycans”

Les SLRP façonnent le réseau tridimensionnel de la MEC. En effet, ces protéines régulent la formation des fibrilles de collagène. Les mécanismes soutenant cette régulation par les SLRP ne sont pas bien connus mais ils influencent la taille et le taux de formation des fibrilles de collagène. La structure de la MEC joue un rôle essentiel dans l'organisation des tissus et la régulation du comportement cellulaire. Les principaux composés non cellulaires de la MEC sont les glycoprotéines, les collagènes et les protéoglycanes et parmi ces protéoglycanes, on

Tableau 1 Classification des SLRPs, adapté d'un tableau de l'article de J. Zappia et al.²⁶

Classes	Motif N-terminal Cystéine	Membres	Type de GAG / glycosylation
I	CX ₃ CXCX ₆ C	BGN: Biglycan	Chondroïtin sulfate Dermatan sulfate N-linked oligosaccharide O-linked oligosaccharide
		DCN: Decorin	Chondroïtin sulfate Dermatan sulfate N-linked oligosaccharide O-linked oligosaccharide
		ASP: Asporin	N-linked oligosaccharide O-linked oligosaccharide
		ECM2: Extracellular Matrix Protein 2	N-linked oligosaccharide Pas de données par rapport au potentiel GAG
		ECMX: Extracellular Matrix Protein X	Pas de données par rapport au potentiel GAG ou la glycosylation
II	CX ₃ CXCX ₉ C	LUM: Lumican	Keratan sulfate Poly-lactosamine
		KTN: Keratocan	N-linked oligosaccharide
		FMOD: Fibromodulin	Keratan sulfate Poly-lactosamine N-linked oligosaccharide
		OMD: Osteomodulin	Keratan sulfate N-linked oligosaccharide
		PRELP: Proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein	N-linked oligosaccharide
III	CX ₂ CXCX ₆ C	EPN: Epiphycan	Chondroïtin sulfate Dermatan sulfate N-linked oligosaccharide O-linked oligosaccharide
		OGN: Osteoglycin	Keratan sulfate Chondroïtin sulfate Dermatan sulfate N-linked oligosaccharide
		OPTC: Opticin	N-linked oligosaccharide O-linked oligosaccharide
		CHAD: Chondroadherin;	Keratan sulfate O-linked oligosaccharide
IV	CX ₃ CXCX ₆₋₁₇ C	NYX: Nyctalopin TSK: Tsukushi	N-linked oligosaccharide
V	CX ₃₋₄ CXCX ₉ C	PODN: Podocan PODNL: Podocan-like protein	N-linked oligosaccharide

trouve les SLRP. Les protéoglycanes sont des protéines qui possèdent au moins une liaison avec un GAG.

Les SLRP sont composés d'un noyau protéique contenant des répétitions riches en leucine (LRR)^{19,26}. Ces répétitions ont un motif commun de 11 acides aminés LxxLxLxxNxL (L=Leucine, isoleucine, valine ou autre acide aminé hydrophobe ; x=Tout acide aminé ; N=Asparagine). Dans les SLRPs, les LRRs sont entourés de régions riches en cystéine conservée. Ce motif confère une morphologie de type solénoïde avec une région concave (Fig. 3). La structure concave est formée de feuillet β successifs, favorisant les interactions avec les ligands, où chaque LRR contribue à la formation d'un feuillet β .

De nombreuses protéines LRR sont connues pour être impliquées dans l'interaction protéine-protéine, les SLRPs ne font pas exception. Ces protéoglycanes semblent avoir des caractéristiques communes facilitant les interactions protéine-protéine avec les cellules et les composants de la matrice²⁷. Leur structure permet à ces protéoglycanes de se lier à un grand nombre de protéines mais également à des récepteurs cellulaires, des facteurs de transcription ou encore des composants de la MEC²⁸. Il a été montré que les SLRPs se lient aux fibrilles de collagène permettant de les protéger de la destruction par des collagénases²⁹.

Les SLRPs sont impliqués dans de multiples voies de signalisation déclenchant diverses réponses cellulaires. Les SLRPs interagissent notamment avec la voie TGF- β régulant par exemple la prolifération des chondrocytes. Des dérégulations de l'expression de ces protéoglycanes interagissant avec un grand nombre de voies pourraient être impliquées dans la pathogenèse de l'arthrose. Différentes études ont effectivement montré des niveaux de SLRPs modifiés chez des patients atteints d'arthrose³⁰⁻³².

Les SLRPs sont divisés en cinq sous-classes. Cette classification est basée sur différents critères comme la phylogénétique et les motifs de répétitions riches en cystéine. Les répétitions riches en cystéine ont un motif conservé Cx_mCxCx_nC où m et n varient selon les sous-classes (Tableau 1)^{26,33}.

Le noyau protéique des SLRP est enrichi par des modifications post-transcriptionnelles dont les plus courantes sont la glycanation, la glycosylation et la dégradation enzymatique ou oxydative²⁶.

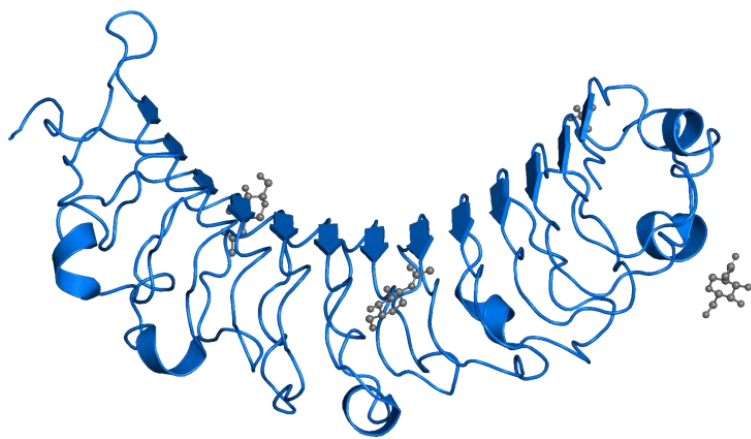


Figure 3 Structure cristallographique de l'ostéomoduline³⁴

1.3.1. L'ostéomoduline

L'ostéomoduline (OMD), également appelé ostéoadhérine, est un SLRP de la classe II. L'OMD est un protéoglycane contenant notamment des kératanes sulfates³². Ce protéoglycane est codé par le gène *Omd* qui contient 3 exons et se trouve chez l'humain sur le chromosome 9. L'OMD a été isolé par Wendel et al. dans des cultures d'ostéoblastes bovins. Cette protéine est exprimée de manière spécifique dans les tissus minéralisés^{35,36}. Comme les autres SLRPs, l'OMD est impliqué dans l'organisation de la MEC. En effet, l'OMD interagit avec le collagène de type I, qui est le composant principal de la MEC osseuse, par des forces électrostatiques faibles^{32,34}. Ces interactions permettent à l'OMD de contrôler le diamètre des fibrilles de collagène de type I et de réguler ainsi la MEC pendant la formation osseuse^{31,37}.

L'OMD a un poids moléculaire de 49,119kDa mais selon les modifications post-traductionnelles ce poids peut atteindre 85kDa. Il est important de savoir que les OMD du sérum et du sécrétome des ostéoblastes ont un poids différent de l'OMD recombinante, cette différence est due à différents niveaux de glycosylation³⁴. L'OMD possède 6 sites potentiels de glycosylation et une région carboxy-terminale acide. Cette dernière région permet la fixation aux cristaux d'hydroxyapatite^{32,38,39}. La surexpression *in vitro* de plasmide codant pour de l'ADNc d'OMD augmente la minéralisation et la maturation des ostéoblastes⁴⁰. Une diminution de l'OMD entraîne une minéralisation anormalement réduite dans les os. Dans l'arthrose, le sécrétome des ostéoblastes est modifié. Parmi ces modifications, il a été observé que l'OMD est diminué dans les ostéoblastes sclérosés (SC) de l'os sous-chondral par rapport aux ostéoblastes non sclérosés (NSC)^{30,31}.

L'OMD est impacté par l'expression de différents facteurs impliqués dans le développement osseux et la différenciation ostéoblastique. En effet BMP2 semble favoriser l'expression de l'OMD alors que l'expression de TGF- β 1 diminue son expression³⁹. Cependant, il a également été montré que l'OMD était capable d'up-réguler l'expression de BMP2. Une affinité entre ces deux éléments a été montrée et cette interaction pourrait expliquer les effets sur la transduction du signal⁴¹.

Récemment, nous avons observé au laboratoire que l'OMD était capable de se lier à RANKL⁴². Cette liaison causerait la diminution drastique de la différenciation des ostéoclastes *in vitro*.

Tableau 2 Avantages et inconvénients du modèle zebrafish

Avantages	Inconvénients
Fécondation externe	Duplication supplémentaire du génome
Transparence des premiers stades de développement	Difficultés à générer des modèles knock-out de maladies en raison des 20 % de gènes de zebrafish qui ont deux copies fonctionnelles
Fécondité élevée	Fonctions divergentes de certains gènes dupliqués
Coût de maintenance raisonnable	Disponibilité limitée d'anticorps contre les protéines du zebrafish
Manipulation génétique relativement facile	
Petite taille	
Modèle de régénération	
Criblage facile de médicament à haut débit	
Croissance rapide	
Combinaison facile de lignées mutantes et de lignées transgéniques avec des rapporteurs fluorescents	

1.4. Le modèle zebrafish (*Danio rerio*)

Au cours des dernières décennies, l'utilisation du modèle zebrafish s'est largement développée, notamment dans le domaine des modèles squelettiques. Le principal modèle animal reste la souris, mais il présente certaines limites, comme la difficulté d'étudier les premiers stades du développement et le coût élevé de la maintenance. Le zebrafish offre une alternative avec de nombreux avantages repris dans le tableau 2⁴³⁻⁴⁵. Ce modèle possède également quelques inconvénients dont les principaux sont cités dans ce même tableau⁴³⁻⁴⁵. Le zebrafish est un poisson osseux d'eau douce qui appartient à la famille des Cyprinidae et à l'infraclasse des Teleostei des poissons à nageoires rayonnées^{44,46}. Ils vivent entre 2 et 3 ans et peuvent mesurer à l'âge adulte jusqu'à 6 cm.

1.4.1. Les zebrafish vs les mammifères

Le zebrafish est un bon modèle pour étudier la physiologie et les pathologies du squelette^{43,44,47}. Cependant, il est important d'être conscient des points communs mais aussi des différences qui limitent leur comparaison avec les mammifères^{44,46,48-51}. Dans le tableau 3, certaines similitudes et différences entre les zebrafish et les mammifères sont détaillées.

1.4.2. Le squelette du zebrafish

Le squelette du zebrafish est composé d'un endosquelette et d'un exosquelette. L'exosquelette, également appelé squelette dermique, contient les écailles, les dents et les rayons des nageoires. Alors que l'endosquelette comprend les éléments crâniens, axiaux et d'autres éléments du squelette.

Les pièces osseuses du zebrafish peuvent être acellulaires ou cellulaires, les caractéristiques de ces pièces ont été détaillées dans un article de Weigele et al.⁵⁰. Différents types d'ossification permettent le développement du squelette. L'ossification endochondrale de type I du zebrafish est similaire à l'ossification endochondrale chez l'homme, cette ossification est présente dans l'os ceratohyal et les rayons de la ceinture pelvienne. L'os hyomandibulaire, les arcs branchiaux, l'ethmoïde et les hypuraux sont eux formés par ossification endochondrale de type II, formant des os tubulaires^{46,50}.

Tableau 3 Comparaisons de diverses caractéristiques entre le zebrafish et les mammifères ^{44,46,48-51}.

	Zebrafish	Mammifères
Génome	Duplication supplémentaire	/
	70% des gènes humains ont au moins un gène orthologue chez le zebrafish	
	80% des gènes liés à des maladies humaines ont au moins un gène orthologue chez le zebrafish	
Cellules squelettiques	Types de cellules squelettiques similaires (chondroblastes, chondrocytes, ostéoblastes et ostéocytes)	
Ostéoclastes	Principalement mononucléés	Multinucléés
Présence d'ostéocytes	Oui (Rare)	Oui
Ossification	Ossification endomembranaire	Ossification endomembranaire
	Ossification endochondrale (Rare) -type I -type II (os tubulaires)	Ossification endochondrale
	Ossification périchondrale	Ossification périchondrale
Types de tissus squelettiques	Nombreux types d'os et de cartilages avec des cellularités différentes	Principalement de l'os cellulaire et du cartilage hyalin
Composition minérale des os	Calcium, phosphate et magnésium	
Collagène	Collagène type X dans les chondrocytes et ostéoblastes	Collagène type X limité aux chondrocytes
	Collagène type II présents dans la matrice cartilagineuse et osseuse	Collagène type II uniquement dans la matrice cartilagineuse
Sources des minéraux	A partir de l'eau via les branchies et la peau	A partir des apports alimentaires
Stockage supplémentaire de calcium	Dans les écailles	/
Articulations synoviales	Oui	

Ce travail se focalisera sur l'étude du crâne contenant un grand nombre de pièces osseuses et cartilagineuses. Le crâne est une structure complexe composée de deux grandes parties : le viscérocrâne (la mâchoire et les dérivées des arcs branchiaux) et le neurocrâne (la base et la voûte du crâne). Ces deux parties proviennent respectivement du mésenchyme mésodermique et des crêtes neurales⁵².

L'étude de la morphologie du squelette est souvent réalisée grâce à la coloration sur spécimens entiers. Les colorations les plus couramment utilisées sont au bleu alcian et au rouge alizarine (Alizarin red).

Le bleu alcian colore la matrice du cartilage. La molécule de bleu alcian est une partie de la phthalocyanine avec un ion métallique central qui est souvent le cuivre (Cu^{2+}) qui fournit la coloration bleue. Cette molécule se lie aux GAG acides sulfatés et carboxylés et aux glycoprotéines présentes dans la matrice du cartilage.

La coloration au rouge alizarine marque les tissus minéralisés. Le rouge alizarine est une dihydroxyanthraquinone qui se lie au Ca^{2+} principalement présent dans les cristaux d'hydroxyapatite. Cette coloration est souvent utilisée pour évaluer le développement des éléments du squelette à un stade précoce mais peut également être utilisée sur les poissons plus âgés.

Ces colorations permettent une analyse morphométrique des éléments du squelette crânien et le scoring de la minéralisation chez les larves de zebrafish. Dans la figure 4 et 5, les différentes pièces du cartilage et des os minéralisés sont représentés schématiquement à différents stades du développement larvaire⁵³⁻⁵⁵.

1.4.2.1. Les articulations synoviales du zebrafish

L'étude de l'arthrose dans le modèle du zebrafish peut être surprenante car la présence d'une articulation synoviale ne paraît pas évidente chez les poissons. Pendant longtemps, les scientifiques ont supposé que les articulations synoviales avaient évolué chez les tétrapodes en réponse à une nouvelle force physique due à la gravité terrestre. Cependant, la morphologie des articulations synoviales a été observée chez des poissons tels que le dipneuste, l'orphie et l'esturgeon, ce qui a remis en question la véracité de cette première hypothèse. Il y a quelques années, l'étude des homologues de la lubricine (Prg4), une protéine importante pour la lubrification des articulations synoviales des mammifères, a fourni des

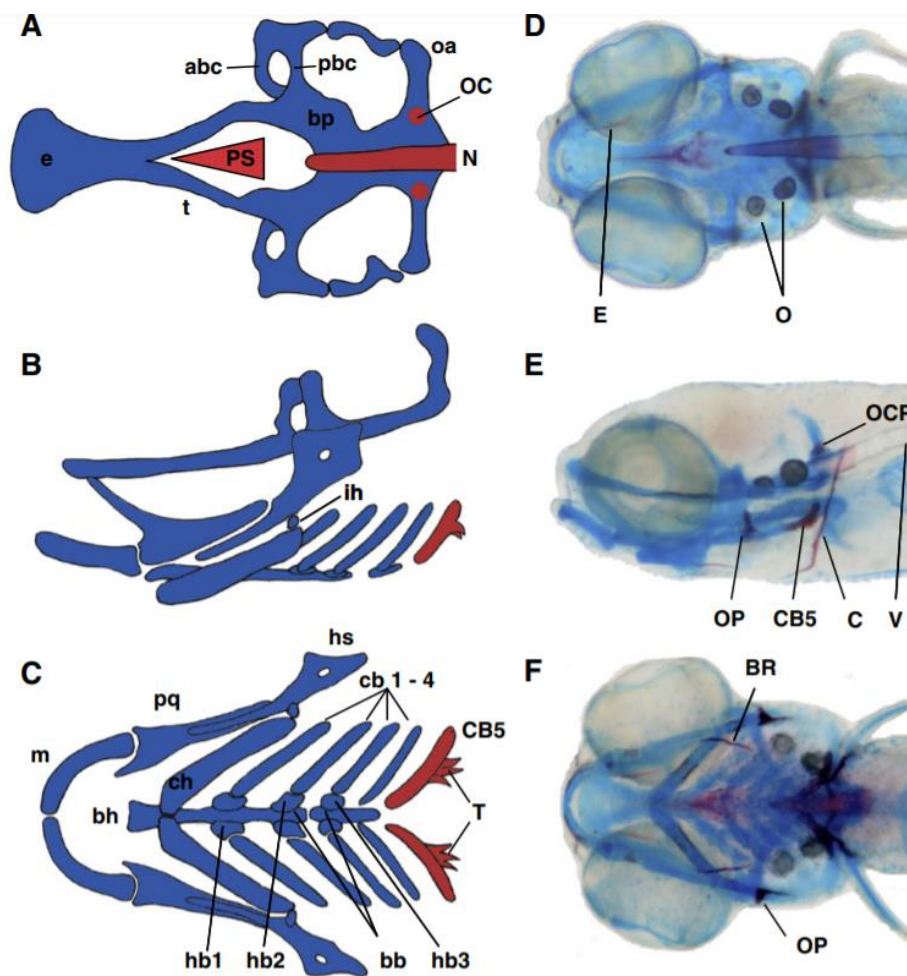


Figure 4 Représentations schématiques et photographies de larves de zebrafish de 144hpf colorées au bleu alcian et au rouge alizarines tirées de l'article de Strecker (2013) et al. lui-même adapté de l'article de Kimmel et al. (2001). Dessin du neurocrâne de zebrafish (A), vue latérale des pièces cartilagineuses de la tête (B) et viscérocrâne (C). Photographies montrant les différents éléments squelettiques de la tête d'une larve de zebrafish avec le cartilage colorés en bleu par le bleu alcian et les os minéralisés en rouge par le rouge alizarine (D-F) Abréviations anglaises utilisés pour le cartilage : abc/pbc — anterior and posterior basicranial commissures = basicranial commissure (bc); bb — basibranchial; bh — basihyal; bp — basal plate; cb1-5 — ceratobranchial 1-5; ch — ceratohyal; e — ethmoid plate; hb — hypobranchial; hs — hyosymplectic; ih — interhyal; m — Meckel's cartilage; oa — occipital arch; pq — palatoquadrate; t — trabeculae cranii.

Abréviations anglaises pour les os/ossifications : BR — branchiostegal rays ; C — cleithrum; CB5 — ceratobranchial 5; E — entopterygoid; N — notochord; OP — opercle; OC — occipitals; PS — parasphenoid; V —

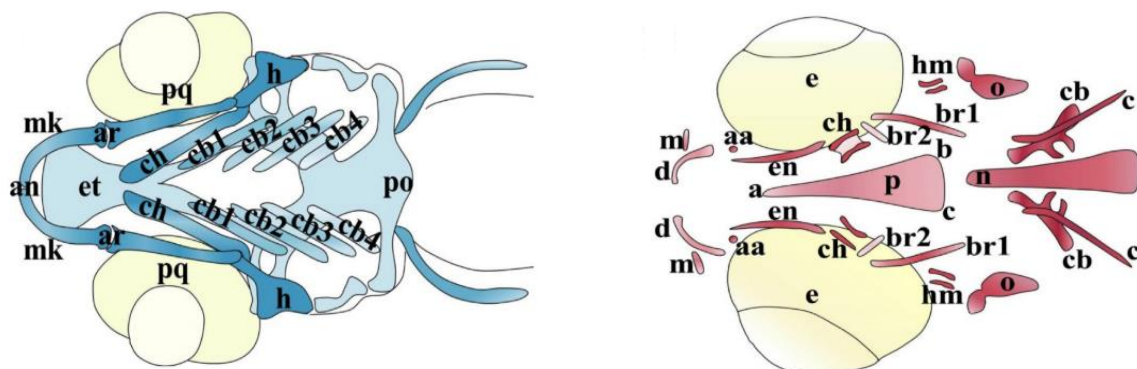


Figure 5 Représentation schématique des différents éléments osseux crâniens révélés par la coloration au rouge alizarine chez les larves de poisson zèbre de 9-10 dpf et des cartilages révélés par la coloration à l'alcian bleu d'après l'article d'Aceto et al.. Limite antérieure (an), articulation (ar), paires cératobranchiales 1 à 4 (cb1-4), cératohyal (ch), plaque ethmoïdale (et), hyosymplectique (h), cartilage de Meckel (mk), palatoquadrate (pq), limite postérieure (po), anguloarticulaire (aa), antérieure (an), rayon branchiostégale1 (br1), entoptérygoïde (en), maxillaire (m), notochorde (n), opercule (o), parasphénoïde (p), rayon branchiostégale2 (br2), cleithrum (c), ceratobranchial 5 (cb), cératohyal (ch), dentaire (d) et hyomandibulaire (hm)

preuves de la présence de véritables articulations lubrifiées chez le zebrafish. La lubricine est en effet sécrétée dans des cavités articulaires entièrement fermées par une capsule conjonctive. Ce type d'articulation se trouve dans les articulations de la mâchoire et dans les nageoires du zebrafish ⁴⁸.

1.4.2.2. Les modèles d'arthrose chez le zebrafish

La présence de gènes homologues entre les mammifères et le zebrafish a permis le développement de modèles d'arthrose chez le zebrafish. Les études sur l'expression différente des gènes chez les patients atteints d'arthrose mettent en évidence certains gènes candidats potentiels pour développer des modèles d'arthrose. Parmi ces gènes, deux ont déjà permis le développement de lignées mutantes exprimant des phénotypes ostéo-arthrosiques. Le zebrafish avec une perte de fonction de Col11a2 dans les articulations présente une arthrose précoce ^{43,56}. Ce gène est principalement exprimé dans le cartilage et sa mutation entraîne une altération de la localisation de la protéine collagène de type II dans le cartilage de la mâchoire ⁵⁶. Un autre modèle de zebrafish ostéo-arthrosique est le double mutant pour Prg4b et Prg4a ^{44,46,48}. Un système de notation OARSI modifié pour le zebrafish montre des défauts croissant sur les articulations associées au vieillissement comme chez l'humain ⁴⁸.

2. Les objectifs et stratégies

Ce travail vise à déterminer plus spécifiquement les fonctions de l'OMD dans le squelette. En effet, les fonctions de l'OMD sont peu connues et une meilleure compréhension de son implication dans l'organisation de la matrice osseuse serait intéressante. L'OMD est étudié dans un contexte de recherches sur l'arthrose visant à déterminer sa potentielle utilisation comme biomarqueur et son implication dans les endotypes de l'arthrose lié à l'os. Afin d'étudier cette question, deux modèles ont été utilisés, un *in vitro* et un *in vivo*.

Pour le modèle *in vitro*, des cultures d'ostéoblastes primaires ont été utilisées. L'activité des ostéoblastes a été caractérisée sur ces cultures traitées avec de l'OMD. L'étude de l'activité de la phosphatase alcaline normalisée par la quantité d'ADN permet de refléter la maturité des ostéoblastes et son évolution potentielle grâce au traitement d'OMD.

Le modèle *in vivo* du zebrafish a été utilisé pour étudier les fonctions de l'*omd* au cours du développement. Le modèle de zebrafish est largement utilisé pour étudier la physiologie et la pathologie du squelette. Le développement de zebrafish mutants est facilité par les techniques CRISPR/Cas9, d'ailleurs différents mutants ont précédemment été développés grâce à cette technique : *omd_5ntdel_cr*, *omd_1ntins_cr* et *omd_84ntins&3ntdel_cr*. Différentes lignées ont été utilisées pour éviter le biais d'éventuels off-target lié à la technique de transgénèse.

La transparence des larves permet de visualiser plus facilement le cartilage et les os du zebrafish à un stade précoce de son développement. Le profil d'expression de l'*omd* chez le zebrafish n'est pas bien connu et l'hybridation *in situ* sur les larves de zebrafish a permis de visualiser ce profil à différents stades de développement. Afin d'évaluer l'impact de la mutation de l'*omd* sur la morphométrie du cartilage du zebrafish, des mesures ont été réalisées grâce à une coloration au bleu alcian à 5dpf (day post-fertilization = jours post-fertilisation), 8dpf et 14dpf sur des larves de zebrafish WT (« Wild Type » = sauvage) et mutantes. Différents paramètres ont été mesurés pour caractériser leur phénotype. Des colorations au rouge alizarine ont également été réalisées sur les larves de zebrafish

permettant la comparaison des scores de minéralisation entre les os de zebrafish WT et *omd* mutants caractérisant ainsi leur phénotype et les effets de la déplétion en *omd*. Des injections d'ARNm d'*omd* ont permis d'évaluer les effets d'une surexpression globale de ce gène dans les larves de zebrafish. Des colorations au bleu alcian et au rouge alizarine ont également été réalisées sur ces embryons. Toutes ces expériences ont pour but de caractériser les fonctions de l'*omd* grâce à sa déplétion ou sa surexpression.

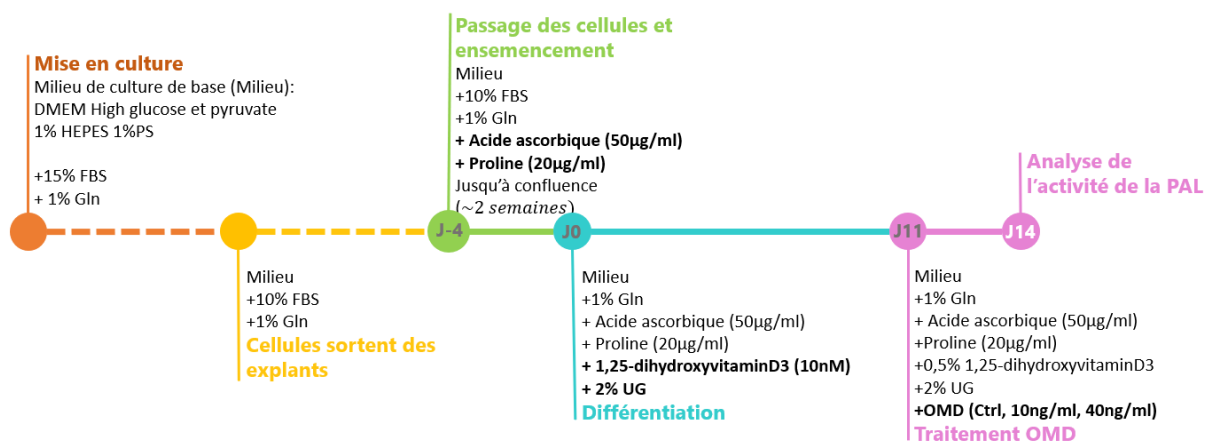


Figure 6 Synthèse des étapes de la culture primaire d'ostéoblastes pour l'analyse de l'activité de la PAL après traitement à l'OMD de 10ng/ml ou 40ng/ml

3. Le matériel et méthodes

3.1. Les cultures d'ostéoblastes primaires

Pour réaliser les cultures d'ostéoblastes, des ostéoblastes humains sont isolés à partir de genoux de patients atteints d'arthrose (Consentement du comité d'éthique : 2012/16JUL/318). L'os sous-chondral cortical, avec ou sans scléroses, est utilisé pour les cultures cellulaires. L'os non sclérotique est sélectionné comme étant de l'os sous-chondral cortical d'une épaisseur inférieure à 1mm provenant du plateau tibial médial.

L'os sous-chondral est disséqué pour enlever le cartilage et l'os trabéculaire, puis les zones sclérosées sont séparées des zones non sclérosées. Les os sont alors fractionnés à l'aide de rogneurs et les fragments d'os sont incubés dans des boîtes T-flask avec du DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Biowest) dans lequel on ajoute de l'HEPES à 10mM (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazineéthanesulfonique, Lonza Biowhittaker, 1M dans 0, 86% NaCl), de la PS à 1% (Biowest L00ZZ-100, Pénicilline 100 unités/ml et Streptomycine 100µg/ml), du FBS à 15% (foetal bovine serum, Biowest 51810-500) et de la glutamine à 2mM (L-glutamine, Biowest X0550-100). Les milieux de culture sont changés deux fois par semaine. Le pourcentage de FBS est réduit à 10% lorsque les cellules sortent des explants.

Les cultures confluentes sont privées des explants et subissent un passage cellulaire et un ensemencement avec un changement de milieu. A ce stade, de l'acide ascorbique à 50µg/ml ((+) Sodium L-ascorbate, Sigma Aldrich SLBR2743V) et de la proline à 20µg/ml (L-proline, Sigma Aldrich SLCC2740) sont ajoutés au milieu précédent.

Quatre jours après cette étape, les cellules sont placées dans un milieu de différenciation où le FBS est remplacé par 2% d'UG (UltroserG, Pall Biosepra 259509/U102-01) auquel on ajoute de 10nM de $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamineD3 (Sigma Aldrich 131170303). Différentes concentrations de rhOMD (Ostéomoduline recombinante humaine, 10ng/ml ou 40ng/ml) sont ajoutées au milieu de différenciation onze jours après la différenciation des cellules. Les cultures primaires d'ostéoblastes subissent ce traitement durant trois jours.

A quatorze jours, les cultures cellulaires sont arrêtées et les surnageants de culture sont collectés et conservés à -20°C dans un masterblock. Ensuite, de la collagénase (1mg/ml dans

Tableau 4 Paramètres physico-chimiques contrôlés dans les systèmes d'élevage des zebrafish.

Paramètres physicochimiques de l'eau d'élevage des zebrafish	
Paramètres	Valeurs
Température	26-28°C
pH	~7,4
Nitrates	< 50 mg/L
Nitrites	< 0,8 mg/L
Ammonium	< 2 mg/L
Dureté carbonate	3-10°KH
Dureté totale	6-16°GH

du PBS (« Phosphate-buffered saline » = Tampon phosphate salin) est ajoutée pendant 15 minutes. Les puits sont par la suite rincés avec du PBS et les cellules sont récupérées en grattant les puits. Les ostéoblastes sont alors centrifugés à 1200rpm pendant 10min. Les culots cellulaires sont séchés et lavés avec du PBS pour une seconde centrifugation à 1200rpm pendant 10min. Les culots cellulaires sont alors stockés à sec à -20°C.

3.1.1. La quantification de l'ADN

Pour quantifier l'ADN, 1ml de Tris 5mM pH7.4 par tube est ajouté aux culots cellulaires sur glace. Chaque tube est soniqué 20 secondes à 50Hz. La suspension est ensuite vortexée et transférée dans un masterblock pour le stockage à -20°C. La quantification de l'ADN est réalisée avec un fluorochrome, le Hoechst, qui est un agent intercalant de l'ADN. 50µl de chaque dilution de la solution standard contenant de 10 µg/ml à 0,625 µg/ml d'ADN ou des échantillons sont placés en triple sur une plaque de 96 puits. 200µl de solution de Hoechst diluée cent fois avec du tampon ADN (NaCl 2M (117g/L), Na₂HPO₄.2H₂O (7,8g/L) et KH₂PO₄ (0,75g/L) à pH 7,2) est ajouté dans chaque puits. La plaque est ensuite laissée à température ambiante à l'abri de la lumière pendant 30 à 45 minutes. La fluorescence est lue avec le Fluoroskan Ascent FL à 355 nm d'excitation et 460nm d'émission.

3.1.2. L'analyse de l'activité de la phosphatase alcaline

Pour la quantification de l'activité de la phosphatase alcaline, 100µl de réactif PAL (para-nitrophénylphosphate) sont ajoutés, dans une plaque 96 puits, à 50µl de chaque dilution de la solution de p- nitrophénol (1000µM à 15.63µM) ou de chaque suspension cellulaire (voir 3.1.1) et incubés à 37°C sous agitation. La densité optique à 405 et 620 nm sont lues avec un spectrophotomètre (ThermoScientific MultiScan GO - Skanit RE 5.0) après 5, 10, 15, 20, 30, 40 et 45 minutes. Après vérification de la zone de temps pour laquelle on obtient une cinétique linéaire de libération de p-nitrophénol à partir du substrat, les valeurs sont rapportées en nmole de p-nitrophénol libéré par minute et par ml de suspension cellulaire. Ces valeurs sont ensuite normalisées par rapport à la quantité d'ADN contenue par puits (voir 3.1.1.).

3.2. Le zebrafish

3.2.1. L'élevage

Les zebrafish sont élevés dans des aquariums organisés en plusieurs armoires (Zeb Tec, Techniplast). Un système de renouvellement de l'eau permet de remplacer 10% du volume

d'eau chaque heure. Les paramètres physico-chimiques sont contrôlés (Tableau 4). Le photopériodisme est d'environ 14 heures de lumière et 10 heures d'obscurité. Les zebrafish sont nourris avec des nauplii d'*Artemia salina* et des flocons de nourriture zebrafeed calibrés en fonction de la taille des poissons. Les embryons sont élevés dans de l'E3 dans des boîtes de Pétri et sont nourris à partir de 5dpf avec des paramécies.

3.2.2. Les lignées de zebrafish

Les zebrafish proviennent de lignées WT et de lignées mutantes homozygotes (consentement du comité d'éthique : 16-1961). Différents mutants ont été développés grâce aux techniques CRISPR/Cas 9 : *omd_5ntdel_cr*, *omd_1ntins_cr* et *omd_84ntins&3ntdel_cr*. Les lignées WT apparentées aux lignées mutantes sont indiquées par le nom de la mutation créée dans la lignée apparentée mais sont suivies par la mention +/-.

Séquence WT de l'*omd*⁵⁷:

```
TTGGCCTCCGAGAGAGATATTC AATCCCACAGATAAAAGAAAAAGCAAATAAACC ATGAC ATTGGCGCAGCTCTTGACAATACTGTGTCTGTTTTGCTC
ACTGGAGTTCTGGTATTTTCTCAAGACTACGAAGAAACCAACTATTCAGACTACGACACGGACCCATCTCTGCCTGAAGCTCCACCACCTTTCTGTAACTC
AACAAACCCGATTATGATTCCAATTAATATATTCATACGACTGTGCCAGAGAGTGTCTGTCCCTCGTCTTATCCCTTCGCCATGTATTGCGACCACCAAAA
ACTCAAGGAAGTCCCAACATCCCAAGGCACATCCGCCACTTGTACATCCAGCATAATGACATAGAAGAGATCACCTCAAAGCCTTTCATCAACGCCACGTC
CCTGAGGGAAATCAACCTCAGTACAACAAGCTCCAGTCATCTAAGGTGGATAAGGATGTCTTCAAAGGCTCAAAGACCTTACGCAGTTACACCTTGAGC
ATAATAATCTGGAAGACATCCCTCTCTTTGCCAAAACTCTTAAAGGCTTATCTGGGATTCAATAAAATTTCAAAGATAGCGGCTGACGCTACACGAG
AGCTTACAAAACCTTACAGTGTGGACTTGGGCAGCAACAGACTAACAGATGCAAGTATTAAAGGCAAGATTCTATCTGGCATGAAGAGCCTCATGCAAATC
ATCCTGTGCAACAATAAGCTGAAATCCATGCCAGCAGACCTTCCAGAATCGATTGAGCAGATATCTCTGAAAAACCACTCAATAGTCTCTATACCCGAGGGT
TACTTCAAGAAGACTCCCAATCTCGTGTCCCTGAGAATGCCGACAATAAACTCAAGTCTGTTGCATACAATGCCTTAAATCTGTCCAAGCTAATGGAGCTC
CATTGGGTATAACAGCTCTCCAAACCGTTTTTTGTTCCAGAACTTGGAAACATCTGTATCTAAATCACAATGACTTTAAAGATCTGAATATCTCTCTAAT
GTGTCCATCACTGGATCTTGGCCACCAAAATATGCTGACCTACATTCGTCTGGACAACAATAAGCTGAGCGGACCAGTGGACTACTACGCTTACAGATGTTT
CCCAAGGCTGATCATGATATTTATGGACACCAAGGAAAGACGATGAAGATGACTCTGAGAAATCTCCAAAAAATACGAAAAACCTGACCGACCAAAA
AAGCCCGGAGGAAGCAAGGCTATTGACACAGAGGTCTGAGATGTGTATGCATAGTTGACAAACCAACCGATTCAATATTCACCTTCAAGTAAATCAAGAT
GATTGAAATATTATTAACATATATTAGTAACCTTAAATCTCCATTCCTGTTGGTTGAAAATCTATTTGACTTTATGCATGAACGTGTTTAAATGAGT
TGCCATTTACAGAAAATTAGCTTTTTTTTATTACTTTTTGCTCCATGAATACAGTAAAAAAAAGTTTATCAATCACTTCAATGCATGTAATGTGTGCCAGA
TAAATAAA
```

Séquences mutantes :

omd_5ntdel_cr :

```
WT      ATGAC ATTGGCGCAGCTCTTGACAATACTGTGTCTGTTTTGCTCACTGGAGTTCTGGTA
Mutant  ---  ATTGGCGCAGCTCTTGACAATACTGTGTCTGTTTTGCTCACTGGAGTTCTGGTA
```

omd_1ntins_cr :

```
WT      ATGAC - ATTGGCGCAGCTCTTGACAATACTGTGTCTGTTTTGCTCACTGGAGTTCTGGTA
Mutant  ATGAC ATTGGCGCAGCTCTTGACAATACTGTGTCTGTTTTGCTCACTGGAGTTCTGGTA
```


omd_84ntins&3ntdel_cr (également nommé *omd 84_3ntdel*):

```
WT      ATGA-----  
Mutant  A ---GAAACTGAGTTACTGTCTGTTTTCCTTGTGGAACGGAGAGCATCGCCTGATGCTCTCCGAGCCAACCAGG  
WT      -----CATTGGCGCAGCTCTTGACAATACTTTGTCTGTTTTGCTCACTGGAGTTCTGGTATTTTCTCAAGA  
Mutant  AAACCCGTTTTT CATTGGCGCAGCTCTTGACAATACTTTGTCTGTTTTGCTCACTGGAGTTCTGGTATTTTCTCAAGA
```

3.2.3. L'hybridation *in situ* de l'*omd*

3.2.3.1. La déshydratation

Les larves sont préalablement euthanasiées avec de la tricaine (400 mg/ml) et fixées par de la PFA (Paraformaldéhyde) 4% pendant 2h à TA (Température ambiante) ou une nuit à 4°C. Les larves sont ensuite rincées trois fois avec 2ml de PBT pendant 5 min. Les larves sont alors placées dans des concentrations croissantes de MetOH (Méthanol) ; 25%, 50% et 75% pendant 5min. Les larves sont finalement stockées dans 2ml de MetOH 100% à -20°C.

3.2.3.2. L'hybridation *in situ* colorimétrique

L'hybridation *in situ* colorimétrique est réalisée sur des larves de zebrafish déshydratées (voir 3.2.3.1.). Les larves pour l'hybridation *in situ* peuvent être élevées jusqu'à 5dpf dans de l'E3 avec du PTU (1-phenyl 2-thiourea) 1X pour éviter la pigmentation. Il n'est pas recommandé de traiter au PTU au-delà de 5dpf pour ne pas perturber le développement des larves.

Jour 1

Si nécessaire, à partir de 3dpf, un blanchiment peut être effectué dans H₂O₂ 2% dans MeOH à TA ou après la réhydratation dans du PBT, pour éliminer les pigments. Une réhydratation par incubations successives de 5 minutes dans 75%MeOH/25%PBT, 50%MeOH/50%PBT, 25%MeOH/75%PBT et trois fois dans 100% PBT est effectuée. Les larves sont ensuite partiellement digérées avec la protéinase K à des concentrations et des durées différentes selon leur stade.

Protéinase K (Thermo Scientific, Vilnius, lot: 00449234, stock ~20µg/µl) :

Pour les larves de 48hpf (« hour post-fertilization » = heure post-fertilisation) -> 40µg/ml à 37°C pendant 30 minutes.

Pour les larves de 4dpf -> 40µg/ml à 37°C pendant 45 minutes

Pour les larves 5dpf -> 50µg/ml à TA pendant 30 minutes

Pour les larves 8dpf -> 40µg/ml à TA pendant 40 à 50 minutes

Après cette étape, les larves sont refixées 20 minutes avec de la PFA 4% et ensuite lavées 5 fois 5 minutes dans du PBT.

La pré-hybridation est réalisée pendant 2 à 5 heures d'incubation à 65°C dans du Hyb Mix +.

L'hybridation est l'étape suivante et le Hyb Mix + est retiré pour être remplacé par 200 µl de Hyb Mix + contenant 20-50 ng de sonde d'ARN antisens d'*omd* marquée au DIG (digoxigénine) et 5% de dextran sulfate. Pour les larves jusqu'à 3 dpf, l'hybridation est effectuée pendant une nuit à 65°C. Pour les larves plus âgées, l'incubation à 65°C dure entre 3 et 4 jours.

Jour 2

Le mélange de sondes est retiré. Les larves sont rapidement lavées dans du 100% HybMix - à 65°C. Plusieurs lavages sont effectués avec une concentration croissante de SSCT et une concentration décroissante de HybMix - . Des lavages de 15 minutes dans 75%Hyb-Mix-/25% 2X SSCT, 50%HybMix-/50% 2X SSCT, 25%HybMix-/75% 2X SSCT et 100% 2X SSCT à 65°C sont réalisés. Ensuite, deux lavages de 30 minutes dans du 0.125X SSCT à 65°C sont effectués. Les larves sont ensuite lavées avec une concentration décroissante de SSCT et une concentration croissante de PBT. Des lavages successifs de 5 minutes dans 75% 0,125X SSCT/25% PBT, 50% 0,125X SSCT/50% PBT et 25% 0,125X SSCT/75% PBT à TA sont effectués. Les larves sont finalement lavées pendant 10 minutes dans du PBT à 100% à température ambiante.

Les larves sont ensuite incubées ≥2h dans 500µl de tampon de blocage à TA. Le tampon de blocage est remplacé par les anticorps anti-DIG-AP (Anti-Digoxigenin_AP Fab fragments, Roche diagnostics GmbH, Mannheim, lot : 32871920) (1/2000) dans le tampon de blocage et incubé pendant la nuit à +4°C.

Jour 3

Les anticorps sont retirés. Les larves sont lavées une fois rapidement et six fois pendant 15 minutes dans du PBT à température ambiante.

Deux incubations de 5 minutes dans le tampon de coloration sont réalisées. Enfin, la coloration est réalisée avec le tampon de coloration enrichi avec 3.5µl de NBT par ml, 3.5µl de BCIP par ml et 1µl par ml de levamisol pour les larves >3dpf à TA. La coloration est contrôlée avec un microscope binoculaire. La réaction est arrêtée en retirant la solution de coloration et en effectuant des lavages approfondis avec du TBS 5X 0,5% Tween. Les larves sont stockées dans du PFA à 1%.

3.2.4. La coloration au bleu alcian

Action	Solution	Temps	Température	Remarque
Collecter	Tricaine (400mg/ml)	/	TA	/
Fixation	4% PFA	Une nuit 2h	4°C TA	/
Rincer	PBT	3x 10 minutes	TA	/
Coloration	Bleu alcian	Une nuit	TA	Sous faible agitation dans le noir
Rincer	80% EtOH / 20mM MgCl ₂	Jusqu'à ce que la solution arrête de devenir bleue	TA	
Hydrater	50% EtOH	5 minutes	TA	/
Hydrater	25% EtOH	5 minutes	TA	/
Bleaching	3% H ₂ O ₂ / 0,5% KOH	20-60minutes	TA	Laisser les tubes ouverts pour les échanges gazeux
Rincer	25% glycérol / 0,1% KOH	2 x 20 minutes	TA	/
Rincer	50% glycérol / 0,1% KOH	10minutes	TA	/
Remplacer et stocker	50% glycérol / 0,1% KOH	/	4°C	/

3.2.5. La coloration au rouge alizarine

Pour les larves de 4 à 14dpf :

Action	Solution	Temps	Température	Remarque
Collecter	Overdose de tricaine	/	TA	/
Fixation	4% PFA	Une nuit 2h	4°C TA	/
Rincer	PBT	3 x 10 minutes	TA	/
Bleaching	3% H ₂ O ₂ / 0,5% KOH	10-20minutes *selon le stade de développement	TA	Laisser les tubes ouverts pour les échanges gazeux
Rincer	25% glycérol / 0,1% KOH	2 x 20 minutes	TA	/
Coloration	Rouge alizarine	30 minutes	TA	Sous faible agitation dans le noir
Rincer et décolorer	50% glycérol / 0,1% KOH	10minutes	TA	/
Remplacer et stocker	50% glycérol / 0,1% KOH	/	4°C	/

Pour les juvéniles de 40 à 50dpf :

Action	Solution	Temps	Température	Remarque
Collecter	Overdose de tricaine	/	TA	/
Fixation	4% PFA	Une nuit 2h	4°C TA	/
Rincer	PBT	3 x 10 minutes	TA	/
Retirer les écailles et éviscérer	/	/	/	/
Bleaching	3% H ₂ O ₂ / 0,5% KOH	30 minutes	TA	Laisser les tubes ouverts
Rincer	PBT	3 x 10 minutes	TA	/
Déshydrater	25% EtOH	5 minutes	TA	/
Déshydrater	50% EtOH	5 minutes	TA	/
Déshydrater	100% EtOH	5 minutes	TA	/
Clearing	100% Acétone	Une nuit (16h)	TA	/
Bleaching	3% H ₂ O ₂ / 0,5% KOH	40 minutes	TA	Laisser les tubes ouverts
Rincer	25% glycérol / 0,1% KOH	2 x 20 minutes	TA	/
Coloration	Rouge alizarine	4h	TA	Sous faible agitation dans le noir
Rincer et décolorer	25% glycérol / 0,1% KOH	Quelques jours	TA	/
Remplacer et stocker	50% glycérol / 0,1% KOH	/	4°C	/

3.2.6. L'acquisition et l'analyse d'images

Les photos des larves et des juvéniles de zebrafish colorés sont prises avec le binoculaire Olympus SZX10 et la source de lumière visible Olympus KL 1500 LCD à 3300K. Les photos des larves d'hybridation *in situ* sont prises avec le microscope AX10 Lab.A1 et la caméra Axiocam 305 color (ZEISS) avec un adaptateur de 0.65X. Ces larves ont précédemment été trempées dans des bains de glycérol à 25%/50%/100%, puis montées sur lame avec une goutte de

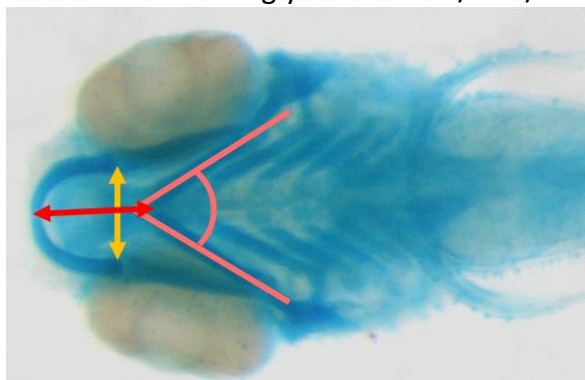


Figure 7 Mesures morphométriques du cartilage. Mesures de l'angle ceratohyal (ROSE), de la distance entre les articulations (ORANGE) et de la distance entre le sommet de l'os ceratohyal et la limite antérieure (ROUGE).

glycérol 100%.

Les mesures morphométriques du cartilage ont été réalisées avec ImageJ. Trois mesures différentes ont été prises à partir des photos (Fig. 7) : l'ouverture de l'angle ceratohyal, la distance entre les deux articulations et la distance entre la limite antérieure de la tête et la pointe de l'os ceratohyal.

Le scoring de la minéralisation est réalisé en attribuant un score entre 0 et 3 (0=Absent, 1=Faible minéralisation, 2= Minéralisation moyenne et 3= Forte minéralisation) aux pièces osseuses étudiées (l'os ceratohyal, l'os hyomandibulaire et le rayon branchiostegal 1) d'après Hoyberghs et al. et Aceto et al.^{53,58,59}.

3.2.7. L'injection d'ARNm

La transcription des ARNm est réalisée à partir de plasmide GFP et de fragments PCR d'*omd* respectivement grâce au kit mMessage mMACHINE®S6 Ultra et au kit mMessage mMACHINE®T7 Ultra (INVITROGEN). Les fragments PCR d'*omd* ont été produits à partir d'une extraction d'ADN de zebrafish WT avec une PCR pour obtenir l'ADNc de l'*omd* suivi d'une PCR nichée pour ajouter la séquence T7. Ces ARNm sont ensuite purifiés grâce au kit d'AllPrep DNA/RNA Mini (QIAGEN). La quantification et la pureté des ARNm sont mesurées grâce au NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Numéro de série : 1403). Les mélanges d'ARNm sont préparés le jour de l'injection avec 0,5% de rhodamine dextran, 1µl d'inhibiteur RNase rRNasin pour 25µl de la solution finale, les ARNm sont dilués à 100ng/µl et complétés avec de l'eau sans RNase. Les gouttes sont directement injectées dans des cellules d'œufs uniques de zebrafish WT AB.

3.2.8. La préparation des solutions

1X PTU : 100ml PTU 10X + 900ml E3

Protéinase K (Thermo scientific, EO0491 20mg/ml): 40µg/ml-> 998µl PBT + 2µl Proteinase K (stock)

PBT (1X PBS - 0.1% Tween 20): 50ml 10X PBS + 2.5ml Tween 20 + 447.5 ml eau distillée

4% PFA: 500ml 1X PBS + 20g paraformaldehyde + 40µl 1N NaOH

Hyb Mix - : 50ml 50% formamide + 25ml 20X SSC pH5 + 100µl Tween 20 + ddH2O à 100ml, 5<pH<6 ajouter ~1ml acide citrique 1M pour acidifier

Hyb Mix + : idem Hyb Mix - + 500µg/ml tRNA + 50 µg/ml héparine

2X SSCT : 50ml 20X SSC + 2.5ml Tween 20 + 447.5ml eau distillée

Tampon de blocage : PBT + 2% sérum de mouton + 2mg/ml BSA

Anticorps anti-DIG-AP (Roche Diagnostics GmbH, Allemagne, REF : 11093274910, LOT : 32871920)

Tampon de coloration (100mM NaCl, 50mM MgCl₂, 100mM Tris-HCl pH9.5, 0.1% Tween 20):
1ml NaCl 5M, 2.5ml MgCl₂ 1M, 5ml TrisHCl pH9.5 1M, 50µl Tween 20 + ddH₂O à 50ml

TBS 5X Tween 0.5X: 100ml 10X TBS + 95ml ddH₂O + 5ml Tween 20

Sondes ARN Omd:

Primers pour la production mRNA *omd* :

- zfOmd-cDNA_F (IDT, 287014319) : 5'-CGA GAG AGA TAT TCA ATC CCA CAG-3'
- zfOmd-cDNA_R (IDT, 287014239) : 5'-TCA ACC AAC AAG GAA TGG AAG-3'
- ZfOmd-cDNA_F_T7 (IDT, 294269456) : 5'-GCG AAT TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG
GCC ACC ATG ACA TTG GCG CAG-3'

H₂O₂ 3%/KOH 0,5% : pour 10ml utiliser 1ml H₂O₂ + 900µl KOH 10% + 8,1ml H₂O distillée
(préparée juste avant le blanchiment)

Rouge alizarine : 0,05% de rouge alizarine dissous dans l'eau à pH neutre.

Bleu alcian 0,04% /10mM MgCl₂/80%EtOH : 1ml bleu alcian (Merck KGaA, Allemagne, HX98469647) +406,6 mg MgCl₂ +80ml EtOH + 19ml H₂O

3.3. Les statistiques

Les différentes statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 6 et le logiciel R combiné avec Rcmdr.

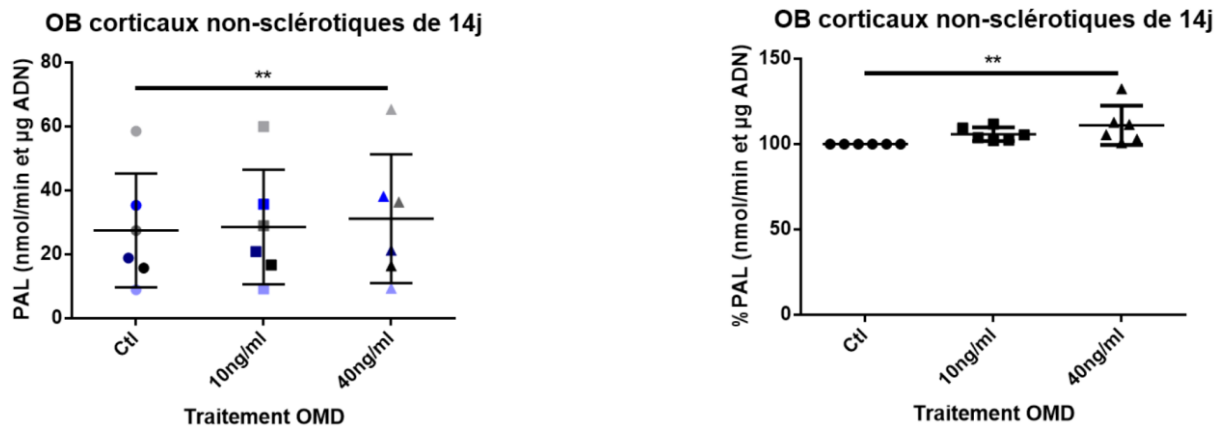


Figure 8 Analyse de l'activité de la PAL de cultures primaires d'ostéoblastes corticaux non-sclérotiques traités les trois derniers jours avec de l'ostéomoduline humaine recombinante à 10ng/ml ou 40ng/ml et arrêtés quatorze jours après leur ensemencement. Analyse ANOVA avec comparaisons multiples des moyennes par rapport à la condition contrôle réalisée sur les résultats des six patients (p value globale=0,0017). Les données obtenues sur chaque patient correspondent à une couleur sur le graphique de gauche. Les résultats obtenus de l'activité de la PAL sont normalisés avec la quantité d'ADN et mis en pourcentage par rapport à leur condition contrôle respective dans le graphique de droite. (Analyses statistiques réalisées sur GraphPad Prism 6)

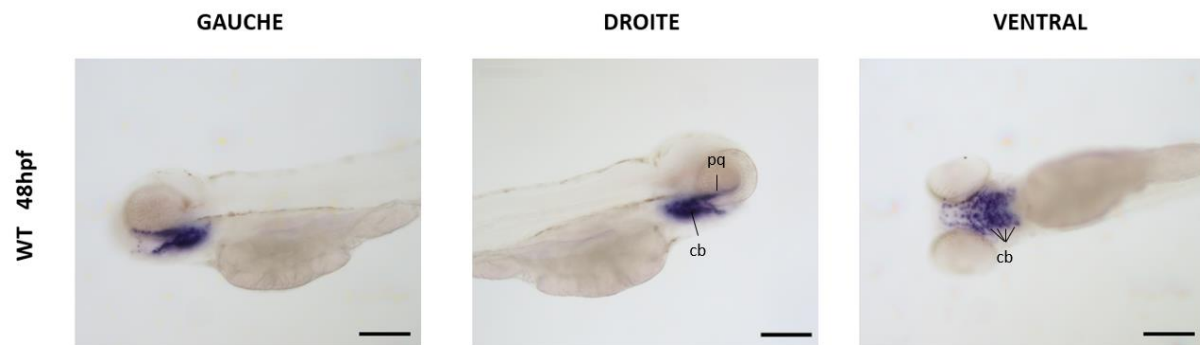


Figure 9 Hybridation in situ omd sur des larves WT à 48 hpf. Marquage colorimétrique omd anti-DIG en bleu. cb=ceratobranchial et pq=palatoquadrate. Barre d'échelle = 200µm

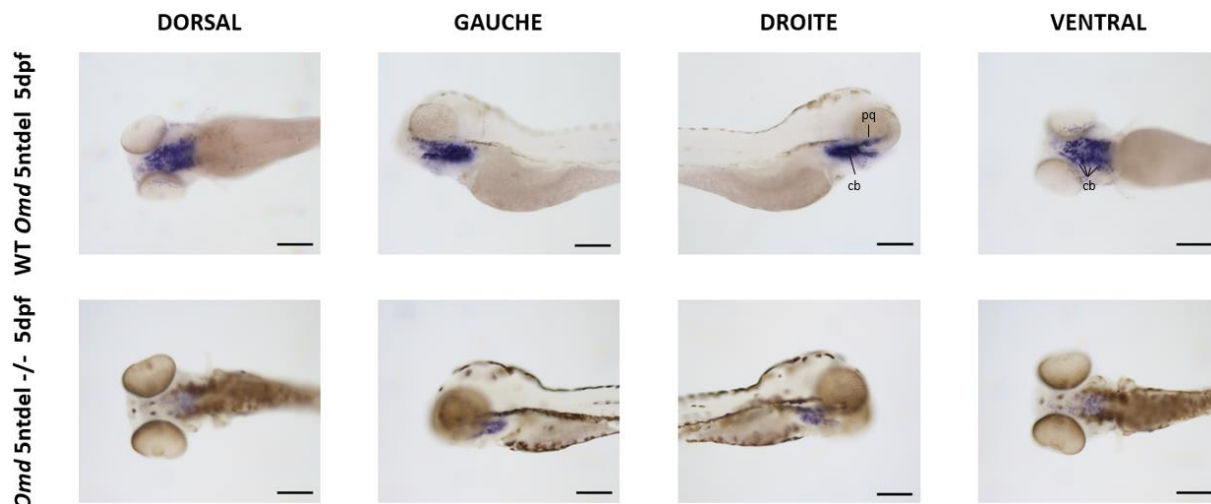


Figure 10 Hybridation in situ omd sur des larves WT et omd homozygotes mutantes (omd 5ntdel -/-) à 5 dpf. Marquage colorimétrique omd anti-DIG en bleu. cb=ceratobranchial et pq=palatoquadrate. Barre d'échelle = 200µm

4. Les résultats

4.1. L'étude de l'ostéomoduline sur les cultures primaires d'ostéoblastes

4.1.1. L'étude de l'activité de la phosphatase alcaline des ostéoblastes

L'activité de la phosphatase alcaline des ostéoblastes a été étudiée sur des cultures primaires d'ostéoblastes provenant de zones non-sclérotiques de genou de six patients arthrosiques. Ces cultures ont été traitées pendant les trois derniers jours avec de l'ostéomoduline humaine recombinante à la concentration de 10ng/ml ou de 40ng/ml. Les ostéoblastes ont été arrêtés après quatorze jours de différenciation. La mesure de l'activité de la PAL permet d'obtenir une mesure reflétant la maturité des ostéoblastes. Cette activité est normalisée par la quantité d'ADN mesurée et mise en pourcentage par patient par rapport au contrôle. Les mesures de l'activité de la PAL sur les six patients sont significativement augmentées (p-value=0,0017) lorsque les cultures sont traitées 40ng/ml par rapport au contrôle non traité à l'OMD.

4.2. L'étude de l'ostéomoduline chez le zebrafish

4.2.1. L'étude des zebrafish *omd* mutants

L'expression de l'*omd* dans le zebrafish n'est pas connue. L'étude de cette protéine dans le zebrafish est intéressante car ce modèle permet de visualiser facilement le développement dès les premiers stades de leur vie. L'utilisation de ce modèle est également très intéressante puisque des lignées mutantes peuvent être développées grâce à la technique de CRISPR/Cas9. Dans le cadre de ce travail trois lignées différentes ont été étudiées : *omd_5ntdel_cr*, *omd_1ntins_cr* et *omd_84ntins&3ntdel_cr*.

4.2.1.1. La caractérisation de l'expression de l'*omd* chez le zebrafish

La localisation de l'expression de l'*omd* a été étudiée grâce à l'hybridation *in situ* de sonde ARN à différents stades du développement des larves de zebrafish (48hpf, 4dpf, 5dpf et 8dpf). Cette étude a été réalisé sur des larves WT et *omd* mutantes.

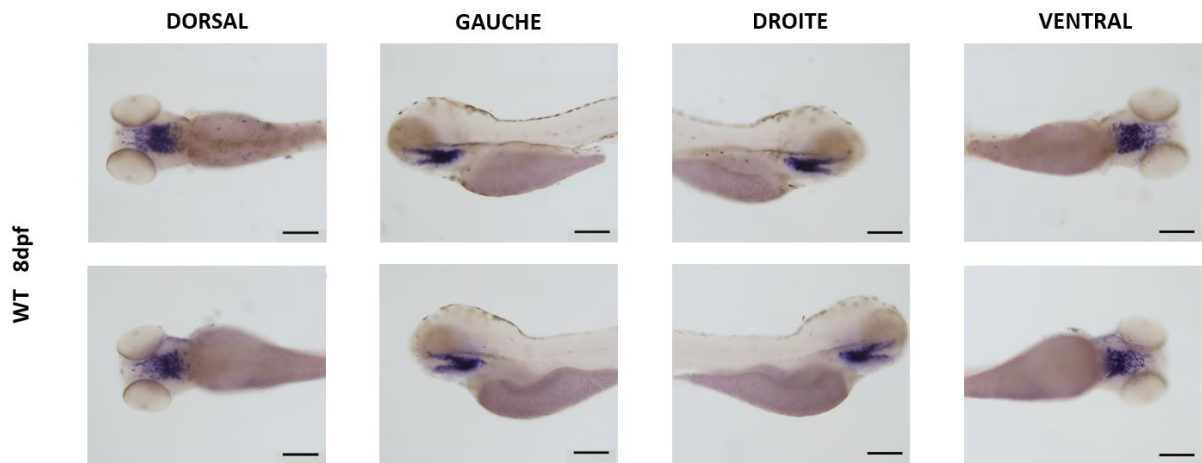


Figure 11 Hybridation in situ omd sur des larves WT à 8 dpf. Marquage colorimétrique omd anti-DIG en bleu. Barre d'échelle= 200µm

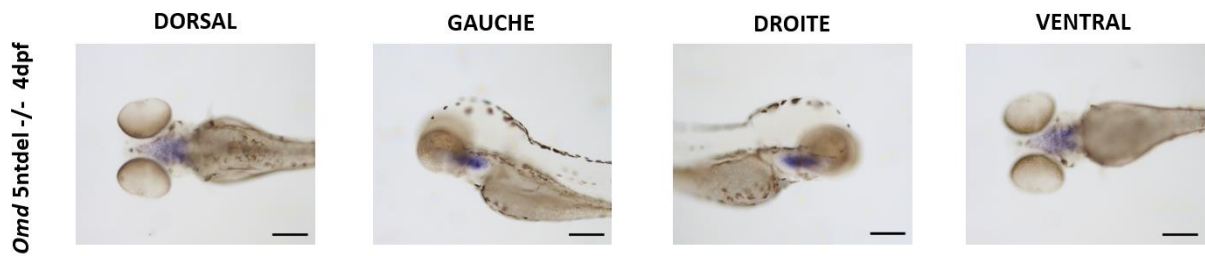


Figure 12 Hybridation in situ omd sur des larves omd homozygotes mutantes (omd 5ntdel -/-) à 4 dpf. Marquage colorimétrique omd anti-DIG en bleu. Barre d'échelle= 200µm

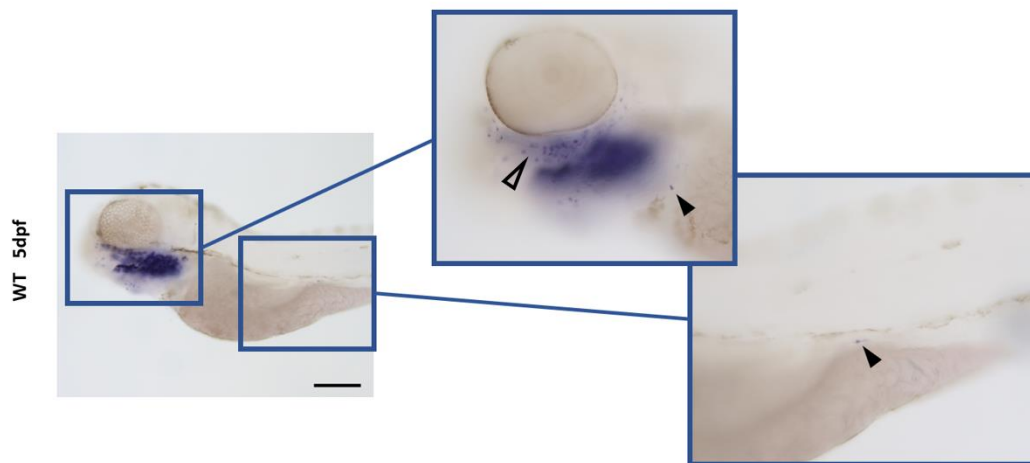


Figure 13 Hybridation in situ omd sur des larves WT à 5 dpf. Marquage colorimétrique en bleu. Barre d'échelle = 200µm

Sur les larves WT de 48 heures, on peut observer une expression spécifique au niveau de différentes pièces du squelette de la mâchoire, tels que les arcs pharyngiens (Fig. 9). Cette expression est toujours visible à 5 et 8 jours de développement (Fig. 10 et 11). On peut observer une nette diminution de l'expression de l'*omd* dans les larves *omd* homozygotes mutantes de 5 jours (*Omd 5ntdel -/-*) par rapport aux larves WT au niveau du squelette de la mâchoire (Fig. 10). Sur les larves *omd* homozygotes mutantes (*Omd 5ntdel -/-*) à 4 jours de développement, on peut également voir un faible marquage pour l'*omd* (Fig. 12).

En plus des zones situées au niveau de la mâchoire des larves, d'autres zones sont marquées (Fig. 13 à 16). Certaines zones autour des globes oculaires semblent exprimer l'*omd* en surface. Différentes zones de marquage le long du sac vitellin sont également visibles à 5 et 8 jours sur certaines larves (Fig. 13 à 16).

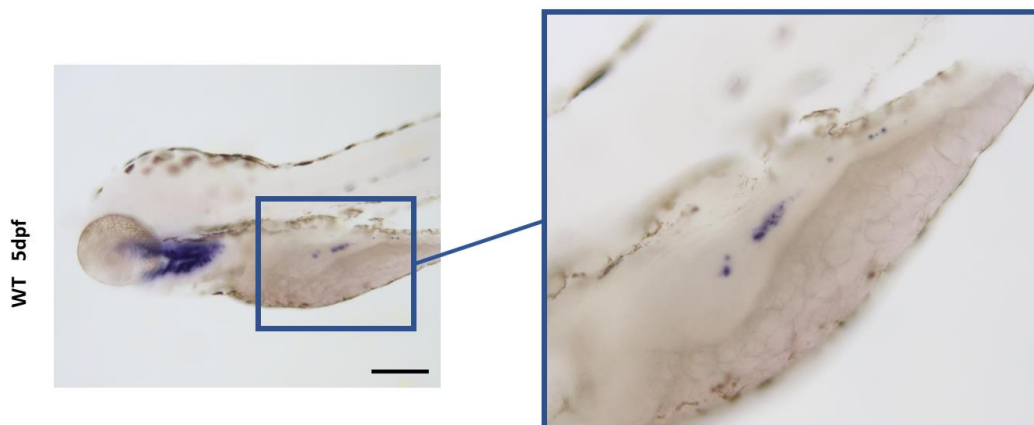


Figure 14 Hybridation *in situ* *omd* sur des larves WT à 5 dpf. Marquage colorimétrique en bleu.
Barre d'échelle = 200 μ m

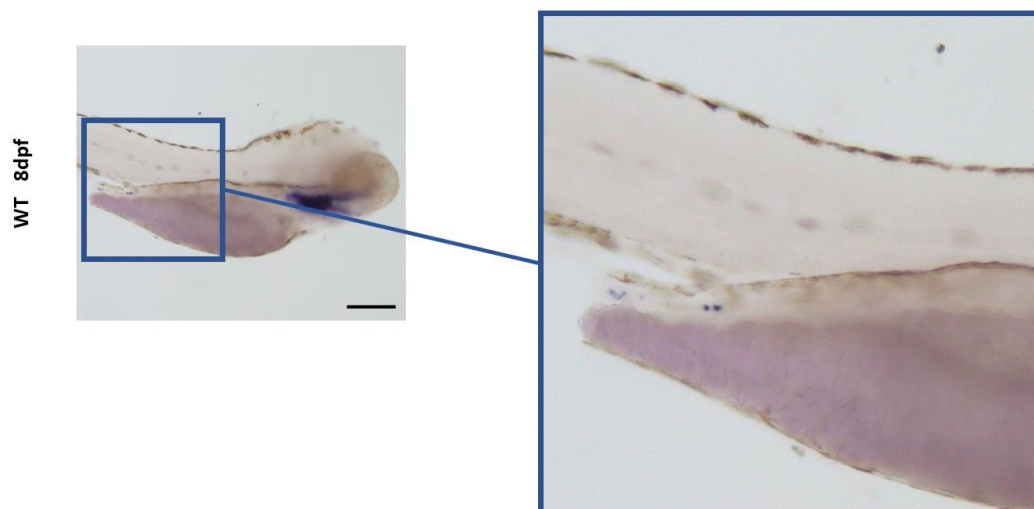


Figure 15 Hybridation *in situ* *omd* sur des larves WT à 8 dpf. Marquage colorimétrique en bleu.
Barre d'échelle = 200 μ m

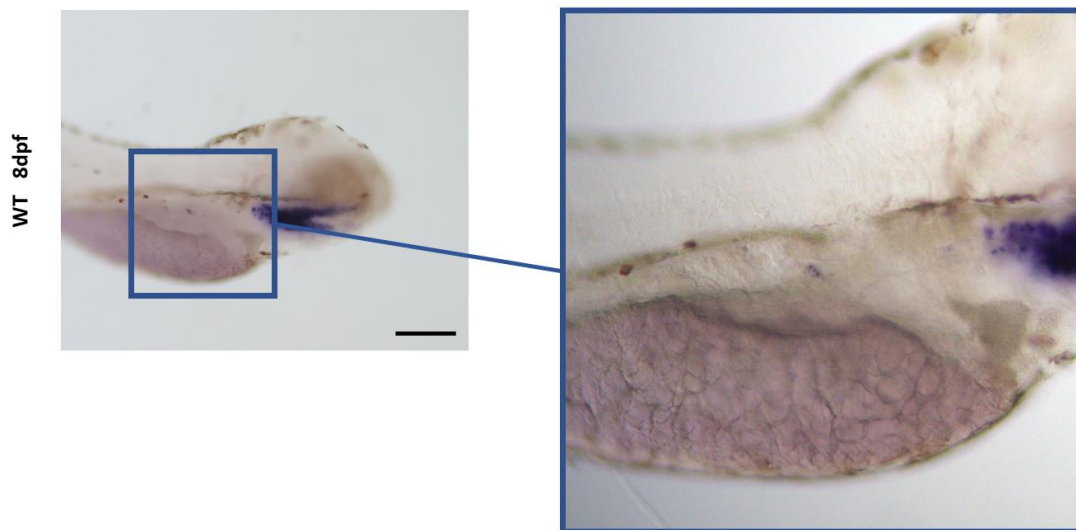
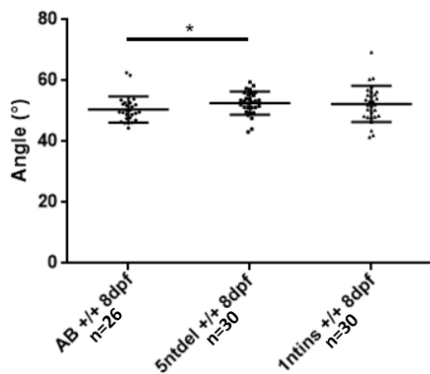


Figure 16 Hybridation in situ omd sur des larves WT à 8 dpf. Marquage colorimétrique en bleu. Barre d'échelle =200µm

Angle ceratohyal AB +/+ vs 5ntdel+/+ vs 1ntins +/+ 8dpf



Angle ceratohyal 5ntdel -/- vs 5ntdel -/- Q 8dpf

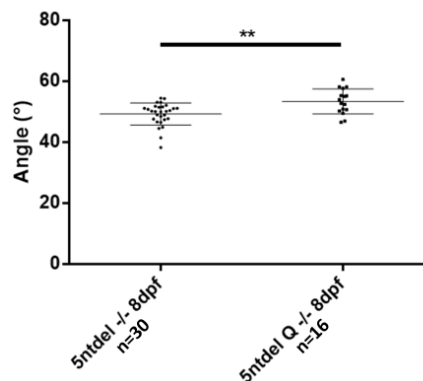


Figure 17 Comparisons et analyses de l'angle ceratohyal : ANOVA (Kruskal-Wallis) avec comparaisons multiples des moyennes pour les comparaisons à plus de deux groupes et t-student (Mann-Whitney) pour les comparaisons de deux groupes : omd_5ntdel -/- ($50,16^\circ \pm 3,642^\circ$) vs omd_5ntdel -/- Q ($53,35^\circ \pm 4,121^\circ$) (pvalue globale=0,0035) (Analyses statistiques réalisée sur GraphPad Prism 6)

Distance entre les articulations AB +/+ vs 5ntdel +/+ vs 1ntins +/+ 8dpf

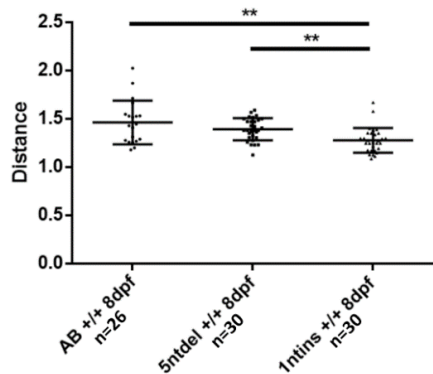
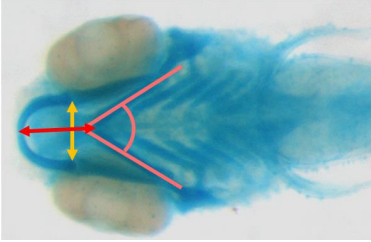


Figure 18 Comparisons et analyses de la distance entre les articulations : ANOVA (Kruskal-Wallis) avec comparaisons multiples des moyennes pour les comparaisons à plus de deux groupes et t-student (Mann-Whitney) pour les comparaisons de deux groupes: AB +/+ ($1,439^\circ \pm 0,2259^\circ$) vs omd_1ntins +/+ ($1,268^\circ \pm 0,1286^\circ$), omd_5ntdel +/+ ($1,381^\circ \pm 0,1140^\circ$) vs omd_1ntins +/+ ($1,268^\circ \pm 0,1286^\circ$) et AB+/+ ($1,439^\circ \pm 0,2259^\circ$) vs omd_5ntdel +/+ ($1,381^\circ \pm 0,1140^\circ$) (pvalue globale= 0,0003) (Analyses statistiques réalisée sur GraphPad Prism 6)

4.2.1.2. Les mesures morphométriques du cartilage

Différentes mesures sur le cartilage ont été réalisées pour observer l'impact des mutations de l'*omd* sur la morphologie du zebrafish. Un grand nombre de mesures morphométriques ont été faites sur les différents génotypes obtenus par croisement de parents homozygotes (*omd_1ntins* +/+ et -/-, *omd_5ntdel* +/+ et -/-, *omd_5ntdel* -/- Q, *84_3ntdel* +/+ et -/- et WT AB). Le tableau 5 résume les résultats obtenus pour les trois mesures réalisées.

Tableau 5 Tableau récapitulatif des résultats des mesures morphométriques du cartilage sur les larves mutantes de zebrafish (*p*value ≤ 0.001 = ***, *p*value ≤ 0.01 = ** et *p*value ≤ 0.05 = *).



	1ntins +/+ vs 1ntins -/-		84_3ntdel +/+ vs 84_3ntdel -/-		5ntdel +/+ vs 5ntdel -/-	5ntdel +/+ vs 5ntdel -/- (Q)
	5dpf	8dpf	8dpf	14dpf	8dpf	8dpf
Angle ceratohyal (ROSE)	/	/	/	↗ (***)	↘ (***)	/
Distance entre les articulations (JAUNE)	/	/	↘ (***)	/	/	/
Distance entre la limite antérieure de la tête et la pointe de l'angle ceratohyal (ROUGE)	/	↘ (*)	/	↗ (*)	↘ (*)	↘ (***)

Les analyses statistiques ont également mis en évidence des différences significatives entre certains génotypes similaires pour ces différentes mesures (Fig. 17 à 19).

**Distance entre la limite antérieure de la tête et la pointe de l'os ceratohyal
AB +/+ vs 5ntdel +/+ vs 1ntins +/+ 8dpf**

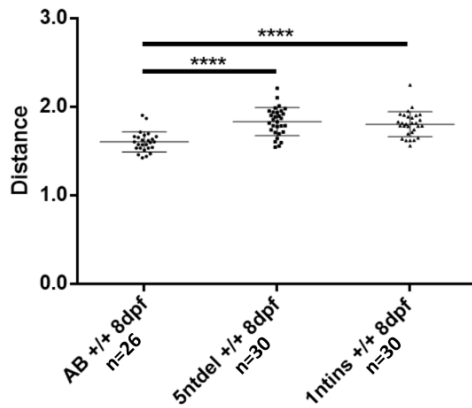


Figure 19 Comparaisons et analyses de la distance entre les articulations : ANOVA (Kruskal-Wallis) avec comparaisons multiples des moyennes pour les comparaisons à plus de deux groupes et t-student (Mann-Whitney) pour les comparaisons de deux groupes : AB +/+ ($1,602 \pm 0,1143$) vs *omd_5ntdel* +/+ ($1,845 \pm 0,1590$) et AB +/+ ($1,602 \pm 0,1143$) vs *omd_1ntins* +/+ ($1,806 \pm 0,1406$) (*p*value globale < 0,0001) (Analyses statistiques réalisées sur GraphPad Prism 6)

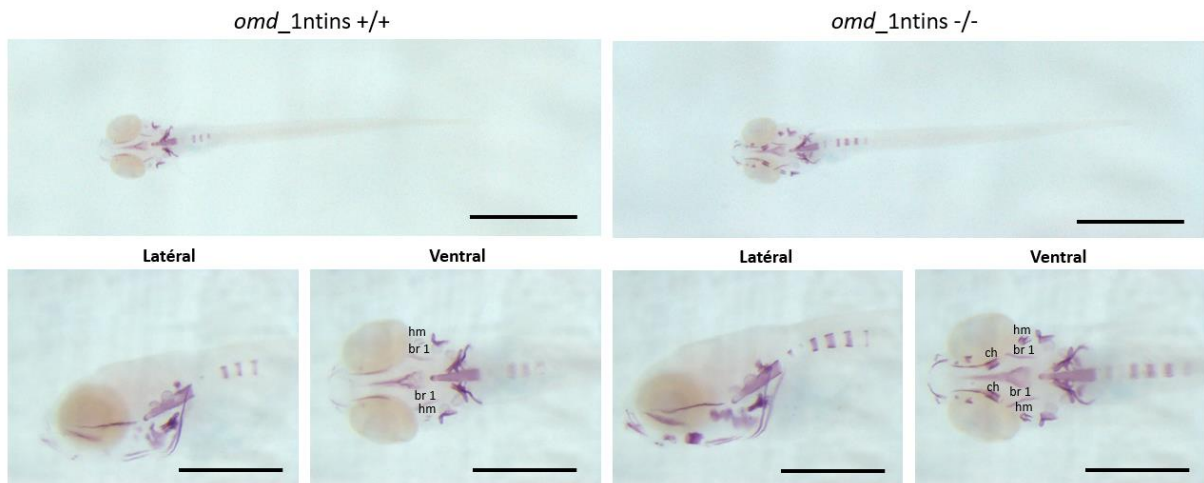


Figure 20 Photographies illustratives de larves de 8dpf colorées au rouge alizarine. *ch*=os ceratohyal, *br1*=os branchiostegal 1, *hm*=os hyomandibulaire. Barre d'échelle pour larves entières = 1000μm. Barre d'échelle pour les larves en vue latérale et ventrale = 500μm.

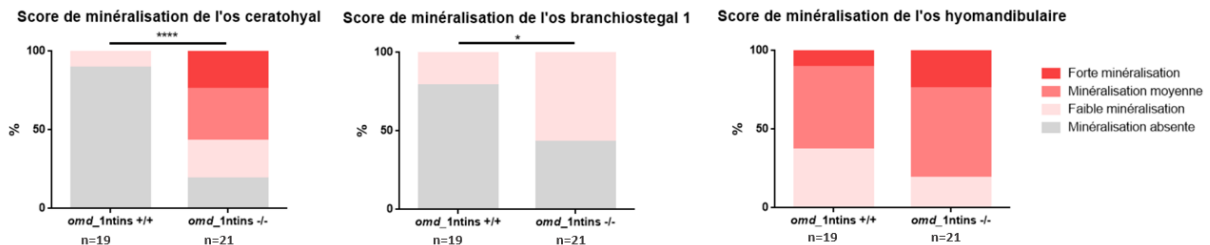


Figure 21 Comparaisons des proportions des scores de minéralisation de l'os ceratohyal : Analyses en tri croisé avec test de Fisher et comparaisons deux à deux : *omd_5ntdel* +/+ vs *omd_1ntins* +/+ (*p*value=0,001531), *omd_1ntins* +/+ vs *omd_1ntins* -/- (*p*value=0,0000811), (*p*value globale= 0,0002066). (Analyses statistiques réalisées avec le logiciel R combiné à Rcmdr)

4.2.1.3. Le scoring de la minéralisation

Le scoring de la minéralisation des trois pièces osseuses montre des différences significatives entre des larves WT et des larves mutantes *1ntins* *-/-* apparentés pour l'os ceratohyal et les rayons branchiostegal 1 à 8dpf (Fig. 21). Aucune différence de minéralisation n'a été mise en évidence pour l'os hyomandibulaire (Fig. 21).

4.2.1.4. L'étude du squelette des zebrafish juvéniles

Les zebrafish mutants ont également été étudiés au stade de juvéniles à 50 jours. Les poissons ont été colorés au rouge alizarine pour visualiser les structures osseuses. Ils ont été pris en photos sous différents angles. Des problèmes au niveau du crâne ont pu être observés. Pour cette comparaison seuls les crânes en bon état ont été conservés (3 pour *omd 5ntdel* *+/+*, 3 pour *omd 5ntdel* *-/-* et 2 pour les *omd 84_3ntdel* *-/-*). Chez les poissons ayant une mutation pour l'*omd* quatre sur cinq ont un problème de sutures du crâne alors qu'aucun des trois poissons WT ne semble montrer un tel phénotype (Fig. 22).

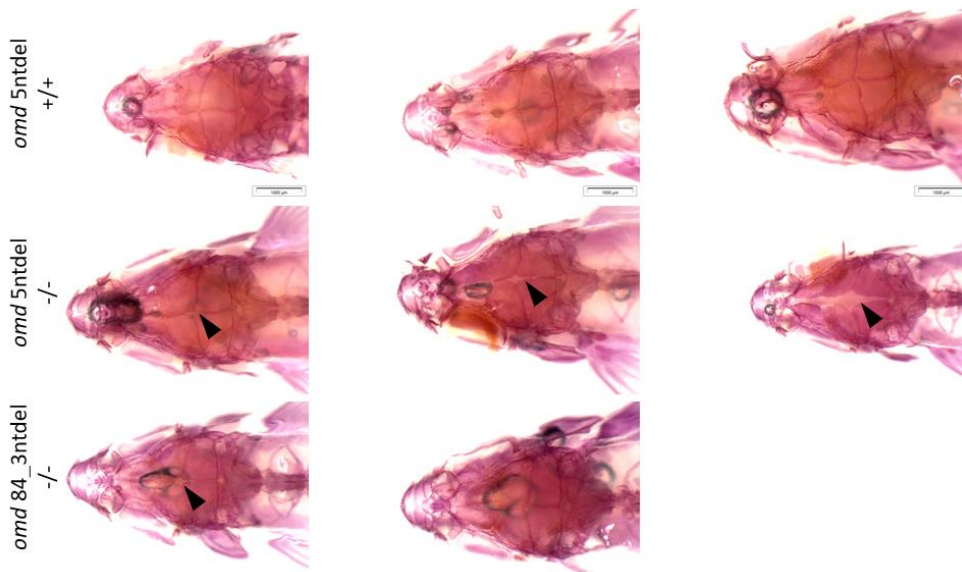


Figure 22 Photos dorsales des poissons juvéniles de 50 dpf colorés au rouge alizarine. Défauts de sutures crâniennes (Flèche noire).

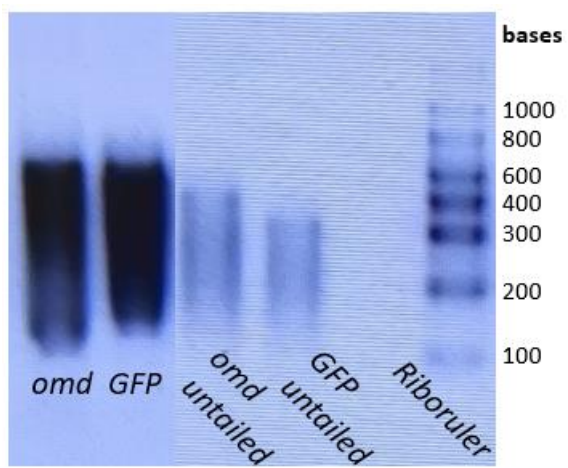


Figure 23 Gel d'agarose 1% des ARN purifiés et les ARN sans queues polyA.

4.2.2. L'étude des zebrafish injectés avec de l'ARNm d'*omd*

Les ARN d'*omd* et de GFP ont été transcrits et puis purifiés. La concentration en ARN de GFP est de 2528,8 ng/ μ l avec un rapport 260/280 de 2,48 et un rapport 260/230 de 2,73. La concentration en ARN d'*omd* est de 1712,5 ng/ μ l avec un rapport 260/280 de 2,50 et un rapport 260/230 de 2,57. Ces solutions ont par la suite utilisé dans le mix d'injection à une concentration de 100ng/ μ l.

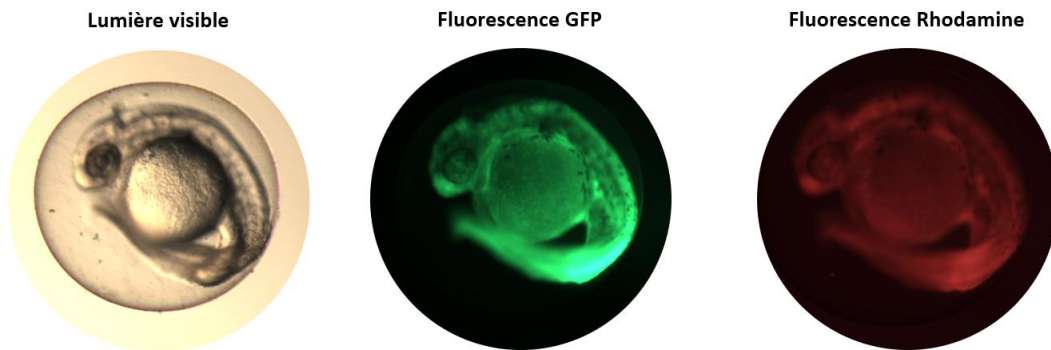


Figure 24 Photos d'un œuf doublement injecté avec de l'ARNm de GFP (0,8ng) de 1dpf. Les trois photos ont été prises avec des lumières différentes pour visualiser la fluorescence de la GFP et de la rhodamine présentes dans le mélange injecté.

Les injections permettent une surexpression d'ARNm d'*omd* de manière ectopique dans les œufs de zebrafish WT. Le contrôle négatif utilisé dans cette expérience est l'ARN de GFP car il n'a pas de fonction biologique au sein de l'organisme du zebrafish. La GFP peut également être visualisée dans les larves après injection.



Proportions de larves ventralisées de 1dpf après l'injection

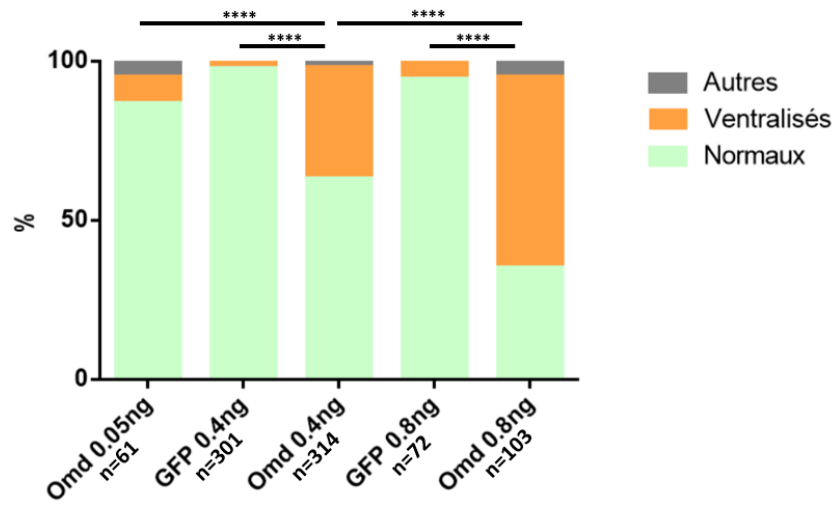


Figure 25 Proportions de larves ventralisées de 1 dpf. Analyses en tri croisé avec test de Fisher réalisé en comparant les conditions ayant reçu les mêmes dosages, les conditions contrôle GFP entre elles et les conditions expérimentales entre elles. (Analyses statistiques réalisées sur le logiciel R combiné avec Rcmdr)

4.2.2.1. L'étude de la mortalité et du phénotype ventralisé à 1 jour après l'injection

Les œufs de zebrafish ne survivent pas tous au cours des premiers jours de développement. Le comptage du nombre d'œufs morts à la suite des injections, nous permet d'évaluer si une augmentation de la mortalité est observée selon la dose et le type d'ARN injecté. Différentes doses d'*omd* et de GFP ont été injectées pour évaluer les effets de l'injection. La comparaison de la mortalité montre une différence significative entre les différents groupes. L'analyse de la mortalité montre une augmentation significative de la mortalité entre les contrôles non injectés et les contrôles GFP injectés à 0.4ng

alors qu'entre les contrôles non injectés et le contrôle négatif injecté doublement avec de l'ARNm GFP aucune différence significative n'a pu être montrée (Fig. 26). La comparaison des contrôles GFP avec les œufs injectés avec des doses correspondantes en *omd*, ne montre pas de différence significative à 0,4ng d'ARN injecté mais il y a une augmentation significative de la mortalité des œufs injectés avec une double dose de 0,4ng d'*omd* (0.8ng) (Fig. 26).

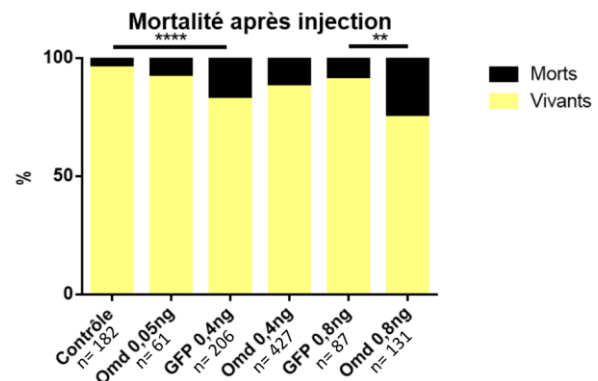


Figure 26 Analyse en tri croisé de la mortalité des œufs un jour après injection d'ARNm. Comparaison des différents groupes avec le test de Chi-squared (pvalue globale <0,0001). Comparaisons avec test de Fisher des conditions contrôles par rapport aux conditions expérimentales ayant reçu une dose d'ARN similaire. Comparaisons des conditions contrôles entre elles et comparaison de la condition *omd* 0.05ng par rapport à la condition contrôle non injectée. (Analyses statistiques réalisées sur le logiciel R combiné à Rcmdr)

Au même stade du développement, des phénotypes de ventralisation ont été observés sur les larves injectées. La ventralisation est caractérisée par une augmentation du volume au niveau de la partie ventrale des larves. La comparaison des proportions de ce phénotype a permis de mettre en évidence une augmentation significative dans les conditions injectées avec l'*omd* par rapport aux conditions avec la GFP à 0,4ng et à 0,8ng (Fig. 25). L'augmentation des doses d'*omd* est également corrélées positivement avec l'augmentation des caractéristiques phénotypiques de ventralisation (Fig. 25).

Proportions de larves malformées à 4dpf

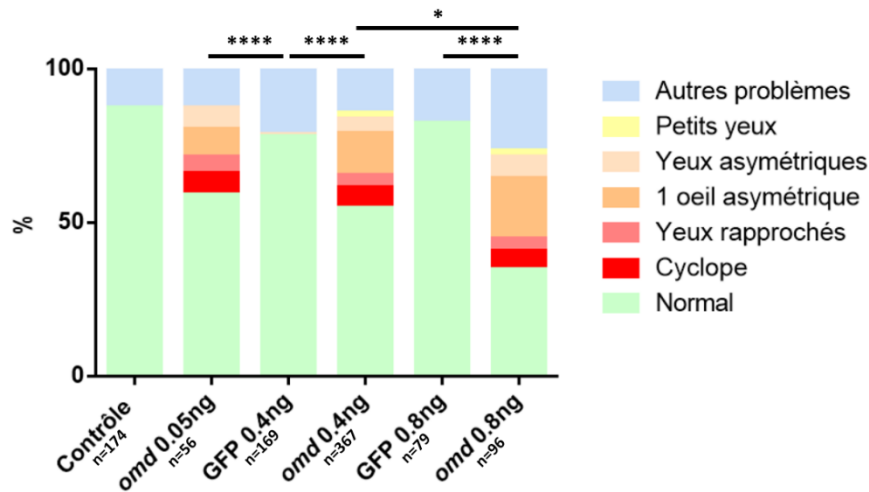


Figure 27 Proportions de larves malformées de 4 dpf après injection d'ARN au stade une cellule. Analyses en tri croisé avec le test de Fisher des conditions contrôles par rapport aux conditions expérimentales ayant reçu une dose similaire d'ARNm et comparaison de la condition contrôle GFP 0.4ng avec omd 0.05ng. Comparaisons des trois conditions contrôles entre elles. Comparaisons deux à deux des conditions expérimentales (Omd 0.05ng vs Omd 0.4ng et Omd 0.4ng vs Omd 0.8ng). (Analyses statistiques réalisées sur le logiciel R combiné à Rcmdr).

Le groupe **normal** comprend les larves ne présentant aucune malformation évidente. La catégorie **cyclopes** comprend les descriptions suivantes : larves pliées-petites-cyclopes et larves cyclopes. La catégorie **yeux rapprochés** comprend les descriptions suivantes : larves fines, larves pliées-petites-yeux rapprochés et larves avec yeux rapprochés. La catégorie **1 œil asymétrique** comprend les descriptions suivantes : larves pliées-1œil-œdème, larves dans chorion-1œil, larves avec queues tordues-1œil, larves difformes-1 œil et larves avec 1 œil sur le côté. La catégorie **yeux asymétriques** comprend les descriptions suivantes : larves pliées-petites-yeux asymétriques, larves dans chorion-yeux asymétriques, larves avec courbure dorsale-yeux asymétriques, larves avec queue tordue-yeux asymétriques, larves difformes-yeux asymétriques et larves avec yeux asymétriques. La catégorie **petits yeux** comprend les descriptions suivantes : larves pliées-petites-petits yeux, larves dans chorion-petits yeux, larves avec courbure dorsale-petits yeux, larves tordues-petits yeux. La catégorie **autres problèmes** comprend les descriptions suivantes : larves pliées-petites, larves pliées-petites-avec masse, larves pliées-œdème, masse, larves avec œdème cardiaque, larves dans chorion, larves avec courbure dorsale, larves avec queue plus courte, larves avec queue tordue et larves avec nageoire caudale pliée.

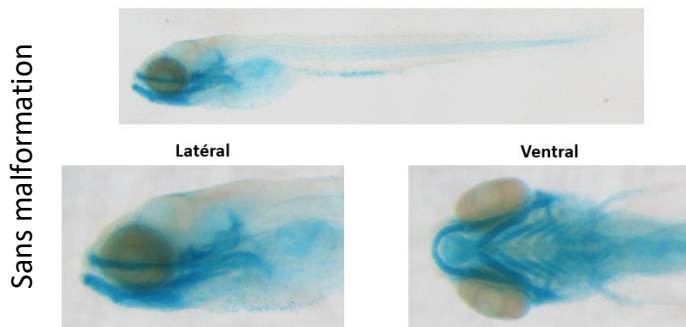


Figure 28 Photos larves WT non malformées de 5dpf colorées au bleu alcian.

4.2.2.2. L'étude des larves malformées de 4 jours

Après quatre jours de développement, les larves injectées sont regardées au binoculaire une à une pour observer leur morphologie. Différentes malformations majeures ont été classifiées et comptabilisées. L'injection avec de l'ARN d'*omd* provoque une augmentation hautement significative des phénotypes malformés des larves et ce en comparaison aux conditions contrôle ayant reçu une dose similaire d'ARN de GFP (Fig. 27). Aucune différence entre les trois conditions contrôle n'a été mise en évidence (Fig. 27). Les larves doublement injectées avec l'*omd* sont significativement plus affectées par rapport aux larves ayant reçu une seule injection de 0,4ng d'ARN (Fig. 27). L'apparition de ces malformations survient déjà à des doses très faible d'ARN d'*omd* (0.05ng) (Fig. 27).

Une partie de ces larves ont été fixées à 5 jours et colorées au bleu alcian permettant de visualiser le cartilage et de distinguer un grand nombre d'anomalies du squelette chez ces larves (Fig. 29). La figure 28 représente les photos d'une larve WT non injectée de 5 dpf ne présentant aucune malformation à mettre en comparaison avec les photos d'illustrations des larves malformées de la figure 29.

4.2.2.3. Les mesures morphométriques du cartilage sur les larves de 5 jours

Des larves qui ont été classées dans le groupe nommé « normal », ne possédant pas de déformations majeures, ont également été fixées à 5 jours et puis colorées au bleu alcian. Des mesures morphométriques ont pu être réalisées sur les photos prises de ces larves. Seules des différences entre les larves contrôle non injectées par rapport à certains groupes de larves ont été mesurées pour les mesures de l'angle ceratohyal et pour la distance entre les deux articulations (Fig. 30). Aucune différence de taille n'a été observée entre les distances allant de la limite antérieure de la tête et la pointe de l'angle ceratohyal (Fig. 30).

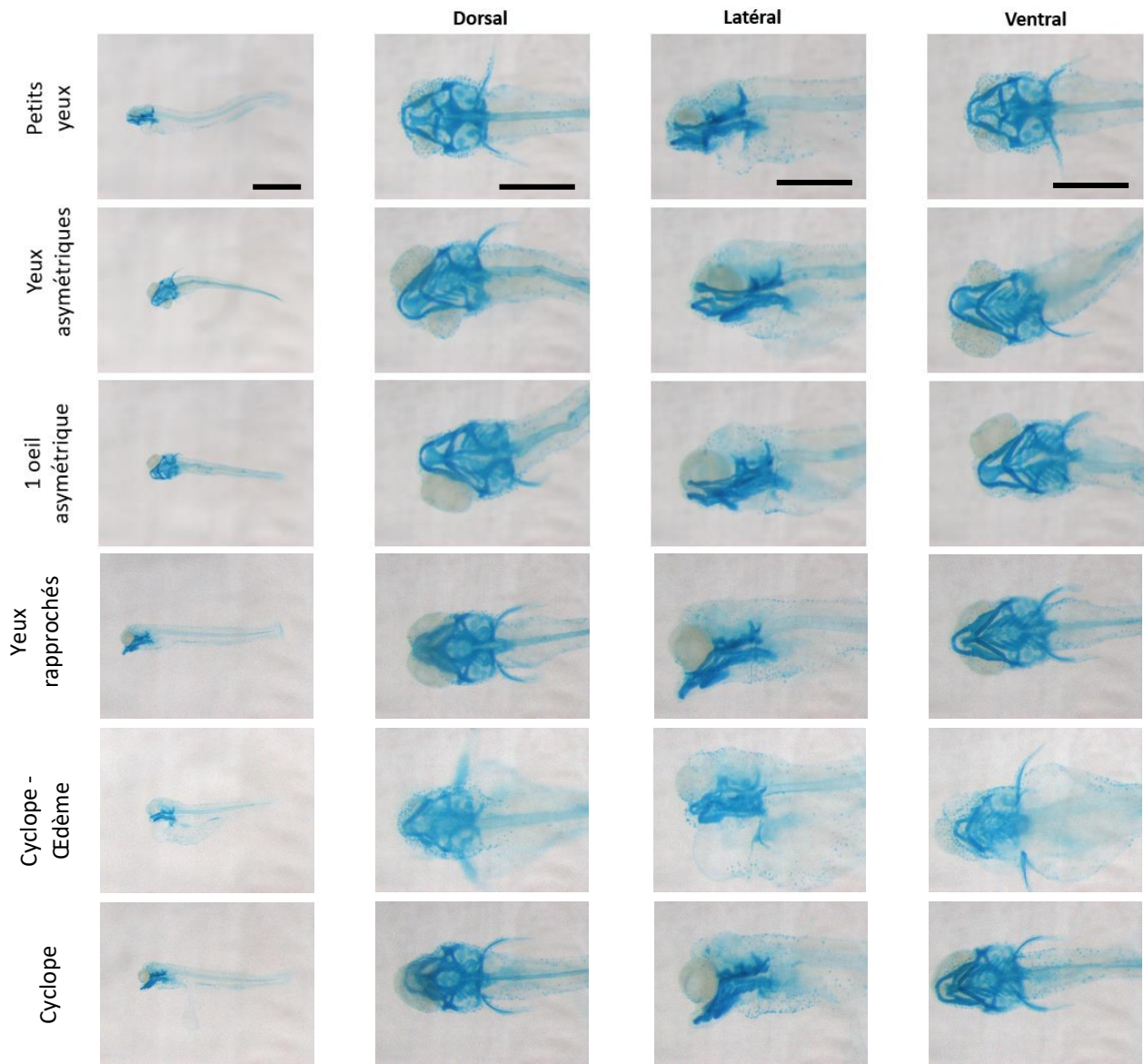


Figure 29 Photos de larves malformées fixées à 5 jours après injection de 0.05ng d'ARN d'omd et colorées au bleu alcian. Barre d'échelle = 1000 μ m pour les photos de larves entières. Barre d'échelle = 500 μ m pour les photos en dorsal, latéral et ventral.

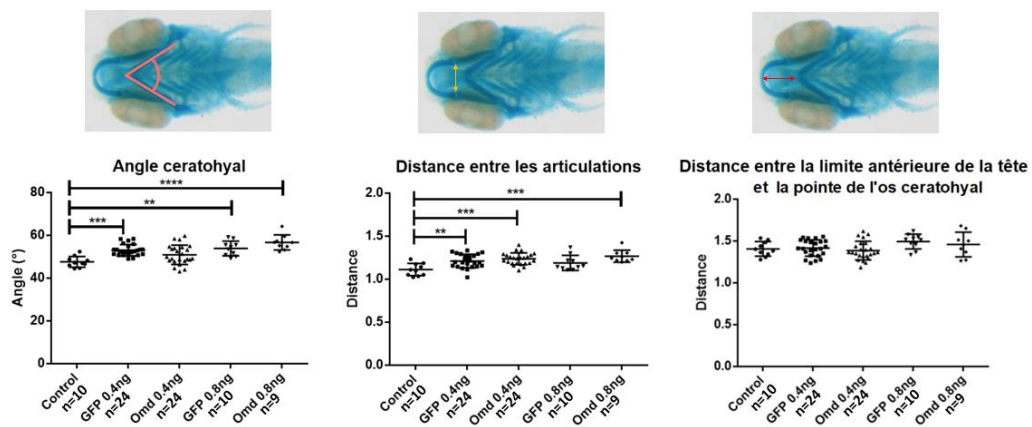


Figure 30 Analyses ANOVA avec comparaisons multiples des moyennes des mesures morphométriques réalisées sur les larves injectées et colorées au bleu alcian à 5 dpf. (Analyses statistiques réalisées sur GraphPad Prism 6)

4.2.2.4. Le scoring de la minéralisation sur les larves de 5 jours

Des larves qui ont été classées dans le groupe nommé « normal » ont été fixées à 5 jours et puis ont cette fois été colorées au rouge alizarine. Cette expérience est en cours d'analyse et permettra de déterminer les différences de minéralisation des pièces osseuses après injection.

5. La discussion

5.1. L'étude de l'ostéomoduline sur les cultures primaires d'ostéoblastes

L'OMD est une protéine spécifique des tissus minéralisés. Son expression par les ostéoblastes est réduite dans les zones sclérosées de l'os sous-chondral arthrosique. Dans l'arthrose, cet os sous-chondral sclérosé présente des anomalies de minéralisation, avec un taux de Ca⁺⁺ diminué par fibre de collagène de type I⁶⁰. Afin d'étudier l'impact de l'OMD sur l'activité des ostéoblastes, nous avons traité des ostéoblastes primaires avec de l'OMD recombinante. Les cultures d'ostéoblastes traitées avec de l'OMD à 40 ng/ml montrent une augmentation de leur activité en PAL (Fig. 8). Cet effet est cohérent avec l'augmentation de la minéralisation observable sur la lignée d'ostéoblastes MC3T3E1 et sur les ostéoblastes de tissus corticaux sclérotiques en présence d'un traitement d'OMD^{31,42}. Cette expérience permet donc de confirmer ces résultats sur des ostéoblastes provenant de tissus corticaux non-sclérotiques de patients arthrosiques. Dans le contexte de l'arthrose, la diminution de l'expression de l'OMD par les ostéoblastes de zones sclérotiques sous-chondrales³¹ pourrait donc bien jouer un rôle clé en initiant ou en favorisant le déséquilibre du remodelage osseux⁴².

5.2. L'étude de l'ostéomoduline chez le zebrafish

Après avoir observé les fonctions de l'OMD *in vitro* sur des cultures primaires d'ostéoblastes, le modèle du zebrafish a été choisi pour les étudier *in vivo*. Tout d'abord, l'expression de l'*omd* a été caractérisée à différents stades du développement. L'hybridation *in situ* sur des larves de 48hpf, 4dpf, 5dpf et 8dpf a permis de montrer une expression spécifique au niveau de pièces squelettiques de la tête pour chacun de ces time-points (Fig. 9 à 12). Les mutants montrent une expression réduite de l'*omd* permettant de renforcer la confiance en ce modèle. Une contre-coloration au bleu alcian permettrait de déterminer la localisation précise de l'expression dans les pièces cartilagineuses de la tête. A ce stade de développement, certaines de ces pièces cartilagineuses sont les précurseurs des futures pièces osseuses^{46,50,61}. L'*omd* est un protéoglycane spécifique des tissus squelettiques, il n'a donc pas été étonnant de le

retrouver dans ces structures. Des colorations en dehors de ces zones cartilagineuses ont également pu être observées (Fig. 13 à 16). Selon la position des colorations au niveau de l'abdomen, celles-ci pourraient correspondre à des zones du pronéphros. Une possibilité serait alors que l'*omd* soit exprimé dans les progéniteurs des ostéoclastes présents dans les reins qui sont, notamment chez le zebrafish, l'organe soutenant l'hématopoïèse⁶². Les marquages ont été observés séparément aussi bien à droite qu'à gauche de l'abdomen mais il serait intéressant de refaire cette expérience sur plus d'individus et/ou à un stade plus avancé pour confirmer la présence bilatérale de ceux-ci. Le pronéphros chez le zebrafish est en effet bilatéral au niveau de l'abdomen alors que le mésonéphros présent à l'âge adulte se trouve dans la partie dorsale du poisson⁶³. Un double marquage *omd* et pronéphros pourrait permettre de confirmer la zone d'expression. Différents marquages des tubules, canaux rénaux ou des précurseurs des ostéoclastes existent pour tester cette hypothèse. On peut par exemple marquer les tubules et canaux rénaux grâce à l'expression de *cdh17* (cadhérine 17)⁶³.

Une autre possibilité serait que ces marquages correspondent à une partie du système gastrointestinal, ce qui pourrait expliquer leur position latérale dans l'abdomen.

Il serait également intéressant d'étudier l'expression de l'*omd* à des stades plus précoces pour mieux comprendre son implication au cours de l'embryogénèse.

5.2.1. L'étude des zebrafish *omd* mutants et étude du squelette des zebrafish juvéniles

L'étude de la morphologie du cartilage sur les larves de zebrafish provenant de croisement entre parents homozygotes montre de grandes variabilités entre les individus d'un même groupe mais également entre des génotypes similaires. Pour limiter les variabilités dues à l'environnement, les larves ont été nourries et élevées dans les mêmes conditions avec un nombre d'individus similaires par groupe étudié. Dans le tableau 5, résumant les résultats obtenus, aucune tendance claire ne peut être dégagée. En effet, seules certaines mesures sont significatives et celles-ci ne varient pas toujours dans le même sens selon la lignée de mutants étudiée.

Dans la figure 17, on peut observer une différence d'ouverture d'angle entre deux groupes d'individus provenant de croisements différents obtenues à partir de parents qui sont de

familles apparentées. Ces familles ont le même génotype mutant et montrent pourtant des différences significatives en termes de morphologie.

S'il y a un effet dû aux génotypes mutants des larves sur la morphologie, il ne semble pas assez important pour être distinguable de la variabilité entre les pontes et les familles. Pour éviter ce problème de variabilité, une solution serait de croiser des parents hétérozygotes et de réaliser toutes les mesures sur une même ponte et par la suite de génotyper chaque individu. Cependant cette méthode requiert plus de temps et il est quasi impossible de distinguer l'insertion de 1 nucléotide chez les mutants *omd_1ntins_cr* sans faire de séquençage.

Dans cette expérience, le choix des mesures réalisées est arbitraire et un grand nombre d'autres mesures pourraient être faites. Les trois mesures prises sont des mesures fréquemment utilisées qui permettent de caractériser la morphologie de la tête. De plus ces pièces cartilagineuses importantes semblent exprimer l'*omd* au début du développement. Cependant d'autres différences pourraient être induites par les mutations de l'*omd* sans que ces différences de phénotype ne soit évidente. Le positionnement de multiples points de repères spécifiques sur les photos prises pourrait permettre d'automatiser la prise de mesures entre ces points. Cette démarche, déjà réalisée par J. Aceto et al., réduirait le temps d'analyses et permettrait d'obtenir un plus grand nombre de mesures⁵³.

Le problème de variabilité se présente également lors du scoring de la minéralisation des pièces osseuses. Le croisement de parents hétérozygotes pourrait être entreprise. Les pièces osseuses scorées sont au nombre de trois mais il serait également possible de réaliser d'autres mesures sur le reste des pièces osseuses visibles. Le scoring de la minéralisation est fait manuellement et est opérateur dépendant. Cette analyse reste donc subjective, peu sensible, et doit donc être faite au minimum par deux opérateurs en double aveugle. Il serait également intéressant de développer un scoring plus objectif qui pourrait par exemple être basé sur une quantification de l'intensité et/ou la surface de coloration.

Une autre possibilité serait que les mutations de l'*omd* ne causent pas de différences morphologiques. Ce protéoglycane pourrait ne pas être impliqué dans des mécanismes majeurs du développement à ce stade ou alors un phénomène de compensation pourrait entrer en jeu. L'ostéomoduline fait partie de la grande famille des SLRPs qui contient

18 membres dont 5 dans la même classe ²⁶. Malgré le rôle spécifique de chacun des membres de cette famille de protéines, des phénomènes de compensation existent. Il a pu être montré qu'en l'absence de fibromoduline, le lumican s'accumule ou qu'en l'absence de biglycane, il y a une augmentation de décorine ^{28,64}. Pour pouvoir déterminer s'il y a une compensation par d'autres membres de la même famille, il serait possible de réaliser une RT-PCR pour quantifier la présence des ARNm respectifs. Il serait également envisageable de réaliser des hybridations *in situ* ou des quantifications de ces protéines.

En plus de l'étude des zebrafish au début de leur développement, des poissons de 50dpf ont été colorés au rouge alizarine. Cette étude a permis d'observer les effets des mutations de l'*omd* à plus long terme sur le squelette des zebrafish. Une comparaison des différents individus a permis de repérer un défaut au niveau des sutures crâniennes chez deux des lignées mutantes *omd* (Fig. 22). Ces défauts repérés à 50dpf pourraient montrer qu'un retard du développement a lieu chez les poissons *omd* mutants. Malgré la présence de l'expression de l'*omd* dès 48hpf chez les larves de zebrafish, il semblerait qu'une mutation de ce gène ne cause des défauts que tardivement dans le développement des individus. Cependant le nombre d'observations étant réduites pour cette expérience, il serait intéressant de réitérer celle-ci avec un effectif plus important.

Il serait également nécessaire de découvrir les voies cellulaires qui entrent en jeu et pourquoi celles-ci ont un impact plus tard dans le développement et pas dès l'expression de l'*omd* chez le zebrafish. Malgré certaines différences les sutures crâniennes des zebrafish et des mammifères sont des structures anatomiques similaires et leur développement semblent être régulées par les mêmes voies moléculaires^{52,65}. Le développement du crâne et la fermeture des sutures crâniennes sont régulés par un grand nombre de voies dont celles des FGF et BMP⁶⁶. Il a récemment pu être démontré que l'OMD était un modulateur de l'activité de BMP²⁴¹. La mutation de l'*omd* pourrait donc avoir un impact sur l'activité de BMP2 lors de la fermeture des sutures crâniennes.

Le crâne est une structure complexe avec deux origines distinctes formant le neurocrâne et le viscérocrâne, provenant respectivement des crêtes neurales et du mésenchyme mésodermique. Le neurocrâne est à l'origine de la base et de la voute du crâne alors que le

viscérocône donne naissance à la mâchoire et à des dérivés des arcs branchiaux ⁵² (Fig. 9 à 16). Selon nos résultats, nous observons une expression de l'*omd* au début du développement qui semble se localiser au niveau des structures du viscérocône. Cependant la mutation du gène *omd* à ce stade ne semble pas causer de défauts de minéralisation et de morphologie du cartilage. Toutefois chez les juvéniles, il semblerait que des défauts apparaissent au niveau du neurocône (Fig. 22). Il serait donc intéressant d'étudier l'expression plus tardive de l'*omd* chez le zebrafish pour mieux comprendre les implications et mécanismes qui entrent en jeu.

Une visualisation plus fine des structures squelettiques du zebrafish pourrait être faite avec une analyse au micro CT. Contrairement aux larves qui sont transparentes, les adultes sont, eux, pigmentés ce qui rend plus difficile l'étude détaillée de leur morphologie. Ce dispositif permettrait de prendre des mesures de volume et représentation 3D chez des zebrafish adultes ou juvéniles. Quelques études ont déjà été menées sur le zebrafish ^{67,68}.

5.2.2. L'étude des zebrafish injectés avec de l'ARNm d'*omd*

Les injections d'ARNm dans les œufs de stade une cellule ont permis d'étudier les effets de la surexpression de l'*omd*. Il faut tout de même garder à l'esprit que cette surexpression est ectopique et qu'elle s'applique donc globalement sur les larves et pas uniquement dans les zones qui expriment habituellement ce protéoglycane.

La première observation qui a été faite est le taux de mortalité chez les larves injectées. Les œufs injectés avec 0,4ng de GFP semblent montrer un taux plus élevé de mortalité par rapport au contrôle alors que la double dose de 0,4ng ne montre pas cette augmentation (Fig. 26). Il est difficile d'expliquer cette différence. A la dose de 0,8 ng, soit une double dose, on observe une différence significative par rapport au contrôle GFP ayant reçu une dose similaire (Fig. 26). L'augmentation de la mortalité à 1dpf, pour les œufs ayant une surexpression d'*omd*, pourrait correspondre à des cas graves de malformations qui ne sont pas compatibles avec le développement des embryons. Ceux-ci équivaldraient aux cas extrêmes de malformations observés à 4dpf.

A un jour post-fertilisation, les œufs correctement injectés sont sélectionnés et parmi ceux-ci de nombreux individus ont un phénotype ventralisé. Cette ventralisation est significativement plus élevée chez les zebrafish injectés avec de l'*omd* (Fig. 25). Des phénotypes de

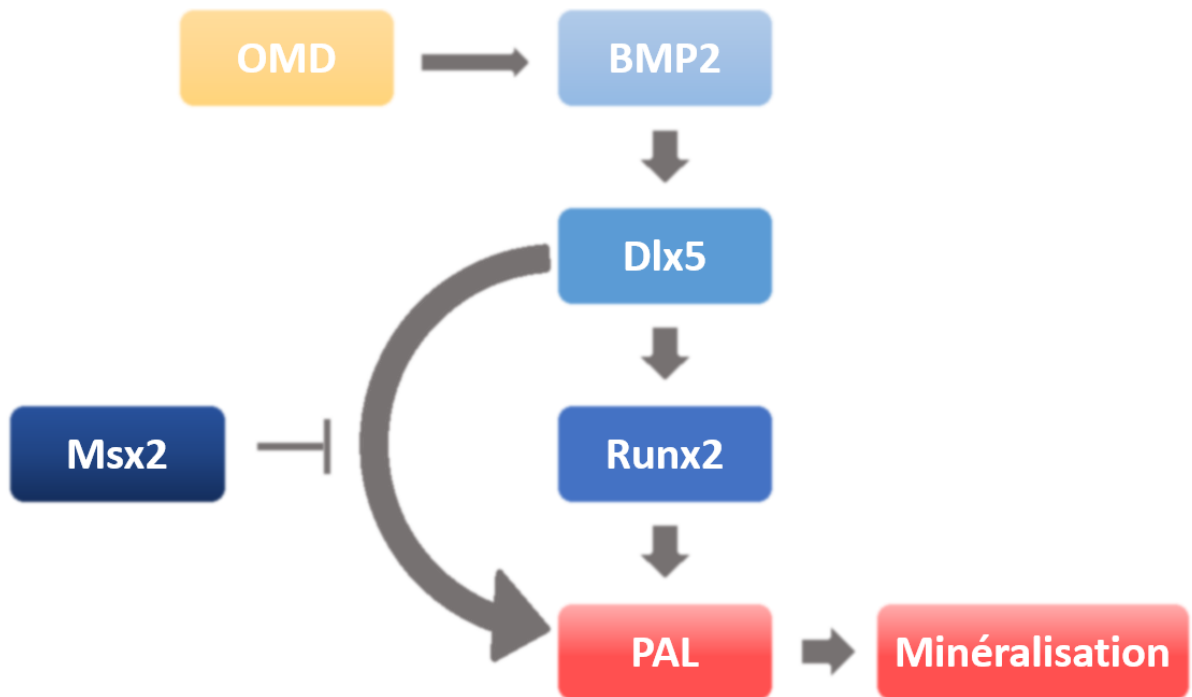


Figure 31 Représentation schématique des liens existant entre l'OMD, BMP2, PAL et la minéralisation. L'OMD favorise l'activation de la voie BMP2. BMP2 va stimuler l'expression de Dlx5 qui va stimuler directement l'expression de la phosphatase alcaline (PAL) ou via Runx2. L'activité de PAL est quant à elle connue pour favoriser la minéralisation.

ventralisation ou de dorsalisation sont fréquemment observés chez les zebrafish mutants. Le développement de l'axe dorsoventral se fait notamment via la régulation de la voie de signalisation BMP aussi bien chez les vertébrés que chez les invertébrés^{69,70}. Cette voie BMP est régulée de manière complexe par des modulateurs de son activité. Ce phénomène a notamment lieu lors de l'embryogénèse et de la formation de l'axe dorsoventral grâce à la présence de gradient. Chez les vertébrés, l'activation de la voie BMP est nécessaire à la ventralisation et la dorsalisation nécessite sa répression. La partie dorsale est quant à elle modelée grâce à la voie Wnt/ β -caténine qui réprime la voie BMP^{70,71}. Des mutations dans ces différentes voies vont causer des phénotypes ventralisés et dorsalisés. L'OMD est un modulateur de l'activité de BMP2. En effet, il semblerait que la présence d'OMD favorise l'interaction du ligand avec son récepteur⁴¹. BMP2 fait partie des morphogènes entrant en jeu dans le développement ventral des embryons^{41,69,70,72}. Une suractivation de cette voie due à l'injection d'ARNm d'*omd* pourrait donc expliquer les phénotypes de ventralisation observés. Cette hypothèse est soutenue par les observations de phénotypes similaires de ventralisation obtenues lors de suractivation de la voie BMP dans le zebrafish et le xenopus^{70,73-79}.

Les interactions de l'*omd* avec des membres de la famille TGF- β pourraient également expliquer les phénotypes cyclopes, les problèmes d'asymétrie à 4dpf et les problèmes crânio-faciaux à 5dpf, tous visibles après l'injection d'ARNm d'*omd*. Des phénotypes de cyclopes ont déjà été observés par Zoeller et al. lors de l'injection d'ARNm de décorine, un protéoglycane faisant également partie de la famille des SLRPs⁸⁰. Il semblerait donc que certains membres de la famille des SLRPs sont impliqués dans les mouvements cellulaires permettant l'établissement de l'axe ventrodorsal. Pour l'*omd*, il semblerait que cette action passe par l'interaction avec BMP2 et son récepteur. Il serait donc intéressant de vérifier l'activation de cette voie via les Smad phosphorylés.

L'augmentation de la proportion des individus déformés est corrélée avec l'augmentation de la dose d'ARNm injecté. Toutefois, parmi les individus qui n'ont pas de déformations visibles évidentes, il ne semble pas y avoir d'effet marqué sur la morphologie du cartilage.

5.3. La connexion entre les différentes observations

L'OMD favorise la stimulation de la voie BMP2 via son interaction avec le ligand et le récepteur BMP2. Cette activation serait également cohérente avec nos résultats montrant une augmentation de l'activité de la PAL observée dans les cultures d'ostéoblastes. Il a

précédemment été montré que BMP2 stimulait l'expression d'ARNm de la PAL et l'activité de celle-ci^{79,81}. L'article de Kim et al. (2004) a permis de mieux comprendre le lien entre l'expression de BMP2 et la stimulation de la PAL⁸¹. Cette activation passerait par Dlx5 qui agirait de manière directe sur le promoteur de la PAL ou de manière indirecte via Runx2. L'activation de cette voie par l'OMD permettrait donc d'augmenter l'activité de la PAL et de ainsi favoriser la minéralisation (Fig. 31). Msx2 (Msh homeobox 2) est une protéine qui est un antagoniste de Dlx5 et qui bloque la stimulation de l'activité de la PAL induite par BMP2⁸¹. Cependant Msx2 semblent également jouer un rôle dans la fermeture des sutures crâniennes^{52,65,66}. En effet, une mutation gain de fonction de Msx2 entraîne la fermeture prématurée de ces sutures, appelée craniosynostose^{1,52}. Ce lien pourrait également être envisagé dans le cadre des défauts de sutures des juvéniles *omd* mutants.

6. La conclusion

Ce travail a permis de confirmer que le traitement d'OMD augmente l'activité de la PAL dans des cultures corticales primaires d'ostéoblastes non-sclérotiques. Au vu des résultats précédemment obtenus montrant la diminution d'OMD dans les cultures d'ostéoblastes sclérotiques et les effets observés de l'OMD sur les cultures non-sclérotiques, ce protéoglycane reste un acteur potentiel de la physiopathologie de l'arthrose.

Les résultats de l'étude de l'*omd* sur le zebrafish ont tout d'abord permis de confirmer la réduction de la présence d'*omd* dans le modèle mutant du zebrafish grâce aux ISH. Ces manipulations nous ont également servi à visualiser l'expression de l'*omd* chez le zebrafish à différents stades. Quelques données à ce sujet devraient encore être récoltées pour obtenir une vision globale de son expression. Il faut également approfondir les recherches pour découvrir quelles structures expriment l'*omd* dans et en dehors des pièces squelettiques de la tête afin de mieux comprendre les fonctions de cette protéine.

L'étude des mutants à des stades précoces n'a pas permis de déterminer les fonctions de l'*omd*. Il faut donc continuer les recherches sur les mutants et investiguer la possibilité d'une compensation de la mutation. Après avoir étudié les stades précoces, des données ont commencé à être récoltées sur les juvéniles. Celles-ci nous laissent penser qu'un impact sur les *omd* mutants, plus tard dans leur développement, causerait des défauts de sutures du crâne chez ces poissons.

Malgré le manque d'informations sur les fonctions de l'*omd*, découvertes grâce aux lignées mutantes, le système de surexpression montre tout de même l'importance de l'*omd*. Des phénotypes de déformations sévères sont engendrés par sa surexpression. L'*omd* pourrait donc jouer un rôle important dans la modulation de l'activité du morphogène, BMP2. Une étude des facteurs en aval de la voie des BMP permettrait une confirmation du rôle de l'*omd*.

Les fonctions de l'*omd* et les voies qui entrent en compte dans le développement des zebrafish sont complexes et doivent encore être précisées. En conclusion, la délétion en *omd* ne semble pas causer de défauts majeurs au stade larvaire mais cette mutation pourrait bien avoir un impact plus tard chez les juvéniles. Il faudrait confirmer ces résultats et découvrir les

mécanismes entrant en jeu. Les études sur le zebrafish nous ont malgré tout déjà permis de mettre en évidence l'impact sévère d'une surexpression d'*omd* dès le début de son développement. Il a été démontré que l'*omd* était exprimé dès 48hpf, ce qui pourrait vouloir dire que l'*omd* joue un rôle très tôt dans l'embryogénèse en régulant l'activité du morphogène BMP2.

On peut dès lors conclure que les fonctions de l'OMD restent encore peu connues, mais certains de nos résultats laissent penser qu'il pourrait réguler l'activité des morphogènes au niveau de la MEC osseuse et/ou cartilagineuse. Cette activité serait également cohérente avec l'augmentation de l'activité de la PAL dans les cultures d'ostéoblastes et l'augmentation de la minéralisation en présence d'un traitement d'OMD.

7. La bibliographie

1. M. Michael Cohen Jr. The New Bone Biology: Pathologic, Molecular, and Clinical Correlates. *Am. J. Hum. Genet.* **221**, 212–221 (2006).
2. Karsenty, G. The complexities of skeletal biology. *Nature* **423**, 316–318 (2003).
3. Maruotti, N., Corrado, A. & Cantatore, F. P. Osteoblast role in osteoarthritis pathogenesis. *J. Cell. Physiol.* **232**, 2957–2963 (2017).
4. Blair, H. C. *et al.* Osteoblast differentiation and bone matrix formation in vivo and in vitro. *Tissue Eng. - Part B Rev.* **23**, 268–280 (2017).
5. Chapurlat, R. D. & Confavreux, C. B. Novel biological markers of bone: From bone metabolism to bone physiology. *Rheumatol. (United Kingdom)* **55**, 1714–1725 (2016).
6. Glyn-Jones, S. *et al.* Osteoarthritis. *Lancet* **386**, 376–387 (2015).
7. Murshed, M. Mechanism of Bone Mineralization. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **8**, 1–11 (2018).
8. Van Der Kraan, P. M. Understanding developmental mechanisms in the context of osteoarthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* **15**, (2013).
9. Olsen, A. D. B. and B. R. Bone development. *Bone* **80**, 14–18 (2015).
10. Vimalraj, S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene* **754**, 144855 (2020).
11. Sodek, J., Ganss, B., Mckeel, D., Physiology, P. & Building, F. OSTEO-PONTIN. **150**, 279–303 (1994).
12. Peng, Y. *et al.* Characterization of Osterix Protein Stability and Physiological Role in Osteoblast Differentiation. *PLoS One* **8**, (2013).
13. Yoshida, C. A. *et al.* Sp7 inhibits osteoblast differentiation at a late stage in mice. *PLoS One* **7**, (2012).
14. Lowery, J. W. & Rosen, V. The BMP pathway and its inhibitors in the skeleton. *Physiol. Rev.* **98**, 2431–2452 (2018).
15. Wu, M., Chen, G. & Li, Y. P. TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res.* **4**, (2016).
16. Sinha, K. M. & Zhou, X. Genetic and molecular control of osterix in skeletal formation.

- J. Cell. Biochem.* **114**, 975–984 (2013).
17. Giorgi, M. Mechanobiological predictions of fetal joint morphogenesis. (2015). doi:10.13140/RG.2.1.5090.4081.
 18. Pamela K Levangie, C. C. N. *Joint Structure and Function: A Comprehensive Analysis*. (2011).
 19. Lories, R. J. & Luyten, F. P. Overview of Joint and Cartilage Biology. *Genet. Bone Biol. Skelet. Dis.* 35–51 (2013) doi:10.1016/B978-0-12-387829-8.00003-2.
 20. Palazzo, C., Nguyen, C., Lefevre-Colau, M. M., Rannou, F. & Poiraudou, S. Risk factors and burden of osteoarthritis. *Ann. Phys. Rehabil. Med.* **59**, 134–138 (2016).
 21. Haq, I., Murphy, E. & Dacre, J. Review: Osteoarthritis. *Postgrad. Med. J.* **79**, 377–383 (2003).
 22. Mobasher, A., Saarakkala, S., Finnilä, M., Karsdal, M. A. & Spil, W. E. Van. Recent advances in understanding the phenotypes of osteoarthritis [version 1 ; peer review : 2 approved]. *F1000Research* **8**, 1–11 (2019).
 23. Pritzker, K. P. H. *et al.* Osteoarthritis cartilage histopathology: Grading and staging. *Osteoarthr. Cartil.* **14**, 13–29 (2006).
 24. Henrotin, Y., Pesesse, L. & Sanchez, C. Subchondral bone and osteoarthritis: Biological and cellular aspects. *Osteoporos. Int.* **23**, 847–851 (2012).
 25. Henrotin, Y., Sanchez, C., Bay-Jensen, A. C. & Mobasher, A. Osteoarthritis biomarkers derived from cartilage extracellular matrix: Current status and future perspectives. *Ann. Phys. Rehabil. Med.* **59**, 145–148 (2016).
 26. Zappia, J. *et al.* From translation to protein degradation as mechanisms for regulating biological functions: A review on the SLRP family in skeletal tissues. *Biomolecules* **10**, (2020).
 27. Ni, G. X., Li, Z. & Zhou, Y. Z. The role of small leucine-rich proteoglycans in osteoarthritis pathogenesis. *Osteoarthr. Cartil.* **22**, 896–903 (2014).
 28. Schaefer, L. & Iozzo, R. V. Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: From genetics to signal transduction. *J. Biol. Chem.* **283**, 21305–21309 (2008).
 29. Geng, Y., McQuillan, D. & Roughley, P. J. SLRP interaction can protect collagen fibrils from cleavage by collagenases. *Matrix Biol.* **25**, 484–491 (2006).
 30. Juchtmans, N. *et al.* Brief report: Distinct dysregulation of the small leucine-rich repeat protein family in osteoarthritic acetabular labrum compared to articular

- cartilage. *Arthritis Rheumatol.* **67**, 435–441 (2015).
31. Sanchez, C. *et al.* Comparison of secretome from osteoblasts derived from sclerotic versus non-sclerotic subchondral bone in OA: A pilot study. *PLoS One* **13**, 1–20 (2018).
 32. Lin, W. *et al.* The role of osteomodulin on osteo/odontogenic differentiation in human dental pulp stem cells. *BMC Oral Health* **19**, 1–8 (2019).
 33. McEwan, P. A., Scott, P. G., Bishop, P. N. & Bella, J. Structural correlations in the family of small leucine-rich repeat proteins and proteoglycans. *J. Struct. Biol.* **155**, 294–305 (2006).
 34. Tashima, T. *et al.* Molecular basis for governing the morphology of type-I collagen fibrils by Osteomodulin. *Commun. Biol.* **1**, 1–10 (2018).
 35. Wendel, M., Sommarin, Y. & Heinegård, D. Bone matrix proteins: Isolation and characterization of a novel cell-binding keratan sulfate proteoglycan (osteadherin) from bovine bone. *J. Cell Biol.* **141**, 839–847 (1998).
 36. Sugars, R. V., Olsson, M. L., Marchner, S., Hultenby, K. & Wendel, M. The glycosylation profile of osteoadherin alters during endochondral bone formation. *Bone* **53**, 459–467 (2013).
 37. Tashima, T., Nagatoishi, S., Sagara, H., Ohnuma, S. I. & Tsumoto, K. Osteomodulin regulates diameter and alters shape of collagen fibrils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **463**, 292–296 (2015).
 38. Sommarin, Y., Wendel, M., Shen, Z., Hellman, U. & Heinegård, D. Osteoadherin, a cell-binding keratan sulfate proteoglycan in bone, belongs to the family of leucine-rich repeat proteins of the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* **273**, 16723–16729 (1998).
 39. Rehn, A. P., Chalk, A. M. & Wendel, M. Differential regulation of osteoadherin (OSAD) by TGF- β 1 and BMP-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **349**, 1057–1064 (2006).
 40. Rehn, A. P., Cerny, R., Sugars, R. V., Kaukua, N. & Wendel, M. Osteoadherin is upregulated by mature osteoblasts and enhances their in vitro differentiation and mineralization. *Calcif. Tissue Int.* **82**, 454–464 (2008).
 41. Lin, W., Zhu, X., Gao, L., Mao, M. & Gao, D. Osteomodulin positively regulates osteogenesis through interaction with BMP2. *Cell Death Dis.* (2021) doi:10.1038/s41419-021-03404-5.
 42. Zappia, J. *et al.* Osteomodulin impacts positively the bone remodeling process in osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **29**, S111.

43. Carnovali, M., Banfi, G. & Mariotti, M. Zebrafish Models of Human Skeletal Disorders: Embryo and Adult Swimming Together. *Biomed Res. Int.* **2019**, (2019).
44. Busse, B., Galloway, J. L., Gray, R. S., Harris, M. P. & Kwon, R. Y. Zebrafish: An Emerging Model for Orthopedic Research. *J. Orthop. Res.* **38**, 925–936 (2020).
45. Mitchell, R. E. *et al.* New tools for studying osteoarthritis genetics in zebrafish. *Osteoarthr. Cartil.* **21**, 269–278 (2013).
46. Tonelli, F. *et al.* Zebrafish: A Resourceful Vertebrate Model to Investigate Skeletal Disorders. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **11**, (2020).
47. Tangredi, B. P. & Lawler, D. F. Osteoarthritis from evolutionary and mechanistic perspectives. *Anat. Rec.* **303**, 2967–2976 (2020).
48. Askary, A. *et al.* Ancient origin of lubricated joints in bony vertebrates. *Elife* **5**, 1–13 (2016).
49. Lleras-Forero, L., Winkler, C. & Schulte-Merker, S. Zebrafish and medaka as models for biomedical research of bone diseases. *Dev. Biol.* **457**, 191–205 (2020).
50. Weigele, J. & Franz-Odenaal, T. A. Functional bone histology of zebrafish reveals two types of endochondral ossification, different types of osteoblast clusters and a new bone type. *J. Anat.* **229**, 92–103 (2016).
51. Arend, M. C. *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome The generation of maps used in the initial assemblies and the production of clone tiling paths were carried out. *Arq. Bras. Cardiol.* **82**, 70–80 (2017).
52. Topczewska, J. M., Shoela, R. A., Tomaszewski, J. P., Mirmira, R. B. & Gosain, A. K. The morphogenesis of cranial sutures in zebrafish. *PLoS One* **11**, 1–23 (2016).
53. Aceto, J. *et al.* Zebrafish bone and general physiology are differently affected by hormones or changes in gravity. *PLoS One* **10**, (2015).
54. Strecker, R., Weigt, S. & Braunbeck, T. Cartilage and bone malformations in the head of zebrafish (*Danio rerio*) embryos following exposure to disulfiram and acetic acid hydrazide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **268**, 221–231 (2013).
55. Kimmel, C. B., Miller, C. T. & Moens, C. B. Specification and morphogenesis of the zebrafish larval head skeleton. *Dev. Biol.* **233**, 239–257 (2001).
56. Lawrence, E. A. *et al.* The mechanical impact of col11a2 loss on joints; Col11a2 mutant zebrafish show changes to joint development and function, which leads to early onset osteoarthritis. *bioRxiv* (2018) doi:10.1101/302307.

57. Sequence omd zebrafish. <http://zfin.org/ZDB-TSCRIPT-090929-4117#summary>.
58. Hoyberghs, J. *et al.* Refinement of the zebrafish embryo developmental toxicity assay. *MethodsX* **7**, 101087 (2020).
59. Aceto, J. *et al.* Effects of microgravity simulation on zebrafish transcriptomes and bone physiology—Exposure starting at 5 days post fertilization. *npj Microgravity* **2**, (2016).
60. Mansell, J. P. & Bailey, A. J. Abnormal cancellous bone collagen metabolism in osteoarthritis. *J. Clin. Invest.* **101**, 1596–1603 (1998).
61. Mariotti, M., Carnovali, M. & Banfi, G. Danio rerio: The Janus of the bone from embryo to scale. *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* **12**, 188–194 (2015).
62. Sharif, F. *et al.* Osteoclast-like Cells in Early Zebrafish Embryos. **16**, 211–224 (2014).
63. Drummond, B. E. & Wingert, R. A. Insights into kidney stem cell development and regeneration using zebrafish. *World J. Stem Cells* **8**, 22–31 (2016).
64. Svensson, L. *et al.* Fibromodulin-null mice have abnormal collagen fibrils, tissue organization, and altered lumican deposition in tendon. *J. Biol. Chem.* **274**, 9636–9647 (1999).
65. Mork, L. & Crump, G. Zebrafish Craniofacial Development. 235–269 (2015)
doi:10.1016/bs.ctdb.2015.07.001.
66. Kim, H. J., Rice, D. P. C., Kettunen, P. J. & Thesleff, I. FGF-, BMP- and Shh-mediated signalling pathways in the regulation of cranial suture morphogenesis and calvarial bone development. *Development* **125**, 1241–1251 (1998).
67. Weinhardt, V. *et al.* Quantitative morphometric analysis of adult teleost fish by X-ray computed tomography. *Sci. Rep.* **8**, 1–12 (2018).
68. Ding, Y. *et al.* Computational 3d histological phenotyping of whole zebrafish by x-ray histotomography. *Elife* **8**, 1–28 (2019).
69. Varga, M., Maegawa, S. & Weinberg, E. S. Correct anteroposterior patterning of the zebrafish neurectoderm in the absence of the early dorsal organizer. *BMC Dev. Biol.* **11**, (2011).
70. Little, S. C. & Mullins, M. C. Extracellular modulation of BMP activity in patterning the dorsoventral axis. *Birth Defects Res. Part C - Embryo Today Rev.* **78**, 224–242 (2006).
71. Li, Y., Li, Q., Longs, Y. & Cui, Z. Lzts2 regulates embryonic cell movements and dorsoventral patterning through interaction with and export of nuclear β -catenin in

- zebrafish. *J. Biol. Chem.* **286**, 45116–45130 (2011).
72. Schier, A. F. & Talbot, W. S. The zebrafish organizer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 464–471 (1998).
 73. Kishimoto, Y., Lee, K. H., Zon, L., Hammerschmidt, M. & Schulte-Merker, S. The molecular nature of zebrafish swirl: BMP2 function is essential during early dorsoventral patterning. *Development* **124**, 4457–4466 (1997).
 74. Little, S. C. & Mullins, M. C. Twisted gastrulation promotes BMP signaling in zebrafish dorsal-ventral axial patterning. *Development* **131**, 5825–5835 (2004).
 75. Goutel, C., Kishimoto, Y., Schulte-Merker, S. & Rosa, F. The ventralizing activity of Radar, a maternally expressed bone morphogenetic protein, reveals complex bone morphogenetic protein interactions controlling dorso-ventral patterning in zebrafish. *Mech. Dev.* **99**, 15–27 (2000).
 76. Neave, B., Holder, N. & Patient, R. A graded response to BMP-4 spatially coordinates patterning of the mesoderm and ectoderm in the zebrafish. *Mech. Dev.* **62**, 183–195 (1997).
 77. Dale, L., Howes, G., Price, B. M. J. & Smith, J. C. Bone morphogenetic protein 4: A ventralizing factor in early *Xenopus* development. *Development* **115**, 573–585 (1992).
 78. Stickney, H. L., Imai, Y., Draper, B., Moens, C. & Talbot, W. S. Zebrafish *bmp4* functions during late gastrulation to specify ventroposterior cell fates. *Dev. Biol.* **310**, 71–84 (2007).
 79. Shen, Q. *et al.* The fibrodysplasia ossificans progressiva R206H ACVR1 mutation activates BMP-independent chondrogenesis and zebrafish embryo ventralization. *J. Clin. Invest.* **119**, 3462–3471 (2009).
 80. Zoeller, J. J. *et al.* A central role for decorin during vertebrate convergent extension. *J. Biol. Chem.* **284**, 11728–11737 (2009).
 81. Kim, Y. J., Lee, M. H., Wozney, J. M., Cho, J. Y. & Ryoo, H. M. Bone morphogenetic protein-2-induced alkaline phosphatase expression is stimulated by *Dlx5* and repressed by *Msx2*. *J. Biol. Chem.* **279**, 50773–50780 (2004).