



**HAL**  
open science

# Rôle de la protéine matricielle Gla (MGP) dans le développement du cartilage sain et pathologique

Alexandre Marano

► **To cite this version:**

Alexandre Marano. Rôle de la protéine matricielle Gla (MGP) dans le développement du cartilage sain et pathologique. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2022. Français. NNT : 2022LORR0237 . tel-04074750

**HAL Id: tel-04074750**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-04074750>**

Submitted on 19 Apr 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES  
UNIVERSITAIRES**

## AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact bibliothèque : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)  
*(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)*

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

## Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

### Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

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

Par Alexandre MARANO

## Rôle de la protéine matricielle Gla dans le développement du cartilage sain et pathologique

Soutenue le 12 Décembre 2022

### Membres du jury :

#### Présidente du jury :

Mme Magali CUCCHIARINI

Professeure, Université de la Sarre,  
Hombourg, Allemagne

#### Rapporteurs :

Mme Claire BARDET

Professeure, Université Paris Cité, URP2496,  
Faculté d'Odontologie, Montrouge, France

Mr David MAGNE

Professeur, ICBMS, UMR 5246  
Villeurbanne, France

#### Examineurs :

Mme Emilie DAMBROISE

Chargé de Recherche, Institut IMAGINE,  
U1136, INSERM, Paris, France

Mr Arnaud BIANCHI

Ingénieur de recherche, UMR 7365 CNRS,  
Nancy France (**directeur de thèse**)

Mr Hervé KEMPF

Chargé de recherche, UMR 7365 CNRS,  
Nancy, France (**co-directeur de thèse**)

#### Membres invités :

Mme Nathalie AUCHET

Maîtresse de conférence, UMR\_S1116 INSERM,  
Nancy, France



# Tables des matières

REMERCIEMENTS .....	6
LISTE DES FIGURES .....	9
LISTE DES TABLEAUX .....	10
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	11
INTRODUCTION .....	16
<b>1. Introduction Générale .....</b>	<b>18</b>
<b>1.1. Les protéines Gla, une famille de protéines vitamine K dépendantes .....</b>	<b>18</b>
1.1.1. La vitamine K .....	18
1.1.2. Les protéines Gla .....	21
<b>1.2. Les protéines Gla impliquées dans la minéralisation.....</b>	<b>25</b>
1.2.1. L'ostéocalcine (BGP).....	25
1.2.2. La Gla Rich protein (GRP) .....	28
<b>2. La protéine matricielle Gla (MGP).....</b>	<b>31</b>
<b>2.1. Découverte et caractéristiques de MGP .....</b>	<b>31</b>
<b>2.2. Le syndrome de Keutel.....</b>	<b>34</b>
<b>2.3. Modèle expérimental animal : les souris <i>Mgp</i><sup>-/-</sup> .....</b>	<b>38</b>
<b>2.4. MGP : Un inhibiteur de la calcification.....</b>	<b>41</b>
2.4.1. MGP et le tissu cardio-vasculaire .....	41
2.4.2. MGP et le tissu ostéo-cartilagineux .....	46
A. Le cartilage trachéo-bronchique .....	46
B. Le cartilage nasal .....	48
C. Le tissu dentaire .....	49
D. le cartilage de croissance.....	49
<b>3. Rôle de MGP dans le développement squelettique.....</b>	<b>51</b>
<b>3.1. Le développement squelettique.....</b>	<b>51</b>
3.1.1. Origine embryonnaire des éléments squelettiques .....	51
3.1.2. Ossification intramembranaire .....	53
3.1.3. Ossification endochondrale .....	55
A. Description du processus d'ossification endochondrale .....	56
B. Facteurs de transcription majeurs de l'ossification endochondrale .....	58
C. Les voies de signalisation majeures de l'ossification endochondrale.....	61
D. La formation des centres d'ossification secondaires .....	65
<b>3.2. Dysplasies squelettiques .....</b>	<b>69</b>
3.2.1. Exemples de dysplasies squelettiques associées au retard de croissance.....	69
A. L'achondroplasie .....	69

B.	La Dysplasie Thanatophore .....	71
C.	le Syndrome d'achondroplasie sévère-retard de développement-Acanthosis Nigricans .....	72
D.	Hypochondroplasie.....	72
E.	Pseudoachondroplasie .....	73
F.	Autre dysplasies squelettiques associée au retard de croissance.....	74
<b>3.3.</b>	<b>Rôle de la signalisation aux FGFs lors du développement squelettique.....</b>	<b>77</b>
3.3.1.	La signalisation aux FGFs.....	77
3.3.2.	Rôle de la signalisation aux FGFs dans le développement squelettique.....	80
<b>3.4.</b>	<b>Rôle de l'autophagie lors du développement squelettique .....</b>	<b>84</b>
3.4.1.	L'autophagie, définition générale et sous-types.....	84
3.4.2.	Mécanismes moléculaires de l'autophagie .....	86
3.4.3.	Rôle de l'autophagie dans la plaque de croissance.....	89
<b>3.5.</b>	<b>Rôle du cil primaire dans le développement squelettique .....</b>	<b>93</b>
3.5.1.	Caractéristiques du cil primaire .....	93
3.5.1.1.	Fonctions du cil primaire.....	96
3.5.2.	Rôle du cil primaire dans le développement squelettique .....	99
<b>3.6.</b>	<b>MGP ET LE DEVELOPPEMENT SQUELETTIQUE .....</b>	<b>101</b>
<b>4.</b>	<b>MGP et le développement de l'arthrose .....</b>	<b>105</b>
<b>4.1.</b>	<b>Le cartilage articulaire.....</b>	<b>105</b>
<b>4.2.</b>	<b>L'arthrose.....</b>	<b>107</b>
4.2.1.	La signalisation aux BMPs et l'arthrose.....	109
4.2.2.	La signalisation aux FGFs et l'arthrose .....	110
4.2.3.	Le cil primaire et l'arthrose .....	110
4.2.4.	L'autophagie et l'arthrose.....	112
<b>4.3.</b>	<b>MGP et l'arthrose.....</b>	<b>113</b>
<b>OBJECTIFS .....</b>	<b>116</b>	
<b>MATÉRIELS &amp; MÉTHODES .....</b>	<b>118</b>	
<b>1.</b>	<b>Génération des souris MGP KO et entretien de la colonie.....</b>	<b>120</b>
<b>2.</b>	<b>Modèle d'arthrose spontanée .....</b>	<b>121</b>
<b>3.</b>	<b>Coloration au Rouge Alizarin/Bleu Alcian et analyse morphométrique des squelettes murins.....</b>	<b>121</b>
<b>4.</b>	<b>Préparation des sections d'os longs de souris.....</b>	<b>122</b>
<b>5.</b>	<b>Marquages histologiques classiques.....</b>	<b>123</b>
5.1.	Coloration Hématoxyline-Eosine-Safran (HES) .....	123
5.2.	Coloration à la Safranine O/Fast Green (SO/FG) .....	124
5.3.	Coloration au Bleu de Toluidine .....	124
<b>6.</b>	<b>Immunohistochimie (IHC).....</b>	<b>124</b>
<b>7.</b>	<b>Hybridation <i>in situ</i>.....</b>	<b>126</b>
7.1.	Préparation des sondes .....	126
7.2.	Marquages par hybridation <i>in situ</i> .....	127
<b>8.</b>	<b>Culture et traitement de chondrocytes articulaires murins.....</b>	<b>128</b>
8.1.	Mise en culture des chondrocytes articulaires murins.....	128
8.2.	Passage des cellules.....	129
8.3.	Traitements des chondrocytes primaires avec du FGF2, FGF18, ou BMP2 recombinant .....	130

<b>9.</b>	<b>Extraction d'ARN et analyse de l'expression génique par qPCR.....</b>	<b>131</b>
<b>10.</b>	<b>Extraction protéique et Western Blot.....</b>	<b>133</b>
10.1.	Extraction des protéines à partir des chondrocytes murins.....	133
10.2.	Western blot.....	134
<b>11.</b>	<b>Analyse statistique des résultats .....</b>	<b>135</b>
<b>RÉSULTATS.....</b>		<b>136</b>
<b>1.</b>	<b>Etude du phénotype squelettique des souris MGP KO .....</b>	<b>138</b>
<b>1.1.</b>	<b>Description des altérations de la plaque de croissance des souris MGP KO.....</b>	<b>139</b>
1.1.1.	Article.....	139
1.1.2.	Figures supplémentaires.....	161
<b>1.2.</b>	<b>Impact de la déficience en MGP sur les acteurs moléculaires de la régulation de la plaque de croissance .....</b>	<b>165</b>
1.2.1.	Marqueurs de la maturation chondrocytaire.....	165
1.2.2.	La voie de signalisation Indian Hedgehog .....	166
1.2.3.	Le cil primaire.....	166
1.2.4.	La voie des BMPs.....	167
1.2.5.	L'autophagie.....	173
<b>1.3.</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>175</b>
1.3.1.	Rôle de MGP au sein de la plaque de croissance.....	175
1.3.2.	Rôle de MGP dans le développement du SOC .....	181
<b>2.</b>	<b>Etude <i>in vitro</i> des acteurs moléculaires impliqués dans la régulation de la plaque de croissance .....</b>	<b>182</b>
<b>2.1.</b>	<b>Modulation du phénotype chondrocytaire .....</b>	<b>182</b>
2.1.1.	Stimulation des chondrocytes par la signalisation aux FGFs.....	182
A.	Stimulation par fgf2.....	182
B.	Stimulation par FGF18.....	185
2.1.2.	Stimulation par la voie des BMPs.....	187
A.	Stimulation de l'expression génique par BMP2.....	187
B.	Etude de l'autophagie lors de stimulations par BMP2 .....	190
2.1.3.	Etude du cil primaire lors des stimulations aux FGFs et aux BMPs .....	192
<b>2.2.</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>194</b>
2.2.1.	Effet de la stimulation par la voie des FGFS sur les chondrocytes MGP KO.....	194
A.	Etude de la stimulation par FGF2 .....	194
B.	Etude de l'effet de la stimulation par FGF18.....	196
2.2.2.	Effet de la stimulation par la voie des BMPs sur les chondrocytes MGP KO.....	198
A.	Etude de l'effet de la stimulation par BMP2 .....	198
B.	Etude de l'autophagie .....	199
<b>3.</b>	<b>Rôle de la protéine matricielle Gla dans le développement de l'arthrose</b>	<b>202</b>
<b>3.1.</b>	<b>Données histologiques .....</b>	<b>202</b>
3.1.1.	Lésions articulaires chez les souris WT (Mgp <sup>+/+</sup> ) .....	203
3.1.2.	Lésions articulaires chez les souris hétérozygotes (Mgp <sup>+/-</sup> ) .....	203
<b>3.2.</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>205</b>

DISCUSSION GÉNÉRALE & PERSPECTIVES.....	208
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	218
ANNEXES.....	248

# REMERCIEMENTS

A Madame la Professeure **Claire Bardet**, Monsieur le Professeur **David Magne**, Madame la Professeure **Magali Cucchiari**, Mme le **Docteur Emilie Dambroise** et Mme le Docteur **Nathalie Auchet** pour avoir accepté de juger mon travail de doctorat. Je leur exprime mes plus sincères remerciements ainsi que ma plus profonde reconnaissance.

A Monsieur le Directeur d'unité **Jean-Yves Jouzeau** et Monsieur le vice-directeur **Bruno Charpentier**, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire IMoPA et m'avoir permis d'y accomplir mon travail de thèse.

A Monsieur **Pascal Reboul**, pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe 4 (Inflammation, Dérégulation Phénotypique Et Remodelage Articulaire Pathologique, IDePRAP) du laboratoire.

A mon Directeur de thèse, Monsieur le Docteur **Arnaud Bianchi** dit « NoNo » pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser une thèse ainsi que pour ses encouragements au cours de ces trois années. Je te remercie pour le coup de pouce technique que tu m'as donné au cours des derniers mois pour les expériences de PCRs et pour les congés que tu as bien voulu me signer, au contraire d'Hervé. J'en profite pour te demander d'acheter une vraie caméra car avec le nombre de visioconférences que nous avons faites au cours de ma thèse, notamment à cause de la pandémie, tu n'as quasiment jamais été visible ou dans le bon sens, et c'est très perturbant de se retrouver face à un homme chauve-souris !

A mon co-directeur de thèse, Monsieur le Docteur **Hervé Kempf** dit « Dr Camphre » pour sa supervision et ses conseils scientifiques, son regard critique mais juste sur mon travail de thèse ainsi que pour m'avoir fait part de son expérience dans le monde de la recherche de manière plus générale. Je le remercie également pour m'avoir encouragé à participer à des ateliers scientifiques européens, à présenter mes résultats lors de congrès nationaux ou internationaux et à développer un club de recherche étudiants au travers du programme ORION de l'Université de Lorraine. Enfin, je le remercie pour tous ces bons moments « non-scientifiques » passés ensemble que cela soit l'initiation au golf, les superbes barbecues annuels de l'équipe ou toutes les discussions (pas toujours) drôles que nous avons eues autour d'un café. Ton obsession pour MGP restera à jamais gravé dans ma mémoire.

A Monsieur le Docteur **Cédric Laurent** et Mr le Docteur **Adrien Baldit** du laboratoire LEM3 de l'Université de Lorraine avec lesquels nous avons collaboré au travers du projet pluridisciplinaire ESCALE de l'Université de Lorraine. Je vous remercie pour cette collaboration et pour la production scientifique associée. Je tiens également à remercier le Dr Baldit pour son aide dans la mise en place du club de recherche étudiant.

A Madame le Docteur **Sarah Beck-Cormier** et Madame le Docteur **Nathalie Auchet** pour avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse. Je les remercie pour le temps consacré à évaluer mes travaux de thèse ainsi que de leurs conseils qui m'ont beaucoup aidé.

A l'**École doctorale BioSE** de l'Université de Lorraine et au **Ministère de l'Éducation Supérieure, de la Recherche et de l'Innovation** (MESRI) qui ont financé ma thèse et les formations/congrès qui l'accompagnent.

A tous les autres membres de l'équipe 4 d'IMoPA, Cécile, Nathalie, Elodie, Emmy, Pascale, Meriem, Fred, David....

Je tiens à remercier spécialement **Cécile Guillaume** pour toute l'aide qu'elle m'a apportée au cours de mes trois ans de thèse, notamment en ce qui concerne l'organisation et la réalisation d'expériences dans le secteur Biologie Moléculaire du laboratoire. De même, je la remercie d'avoir toujours été là pour m'aider à retrouver et/ou commander des produits. Je la remercie également pour la bonne ambiance qu'elle a su apporter au sein du laboratoire et lors de moments plus informels, notamment au travers d'un humour de qualité. J'espère n'avoir pas démerité comme dernier étudiant en thèse avant ta retraite. Tu vas beaucoup me manquer ainsi qu'à l'ensemble du laboratoire. Je te souhaite le meilleur pour la suite.

A **Nathalie Presle**, spécialement pour m'avoir enseigné la préparation et la coupe d'échantillons histologiques ainsi que l'évaluation de l'arthrose au niveau d'articulation de rongeur. Je te remercie également pour ton soutien moral et la bonne ambiance que tu as apportée aux travers de vos interactions type « Muppets show » avec Cécile.

A **Emmy Joubert**, spécialement pour notre entraide mutuelle, notamment au niveau du secteur histologique. Je te remercie aussi pour tous les bons moments passés au sein ou en dehors du laboratoire. Pour citer une grande penseuse moderne : « nous avons commencé collègue-Ami et finit Ami-Ami ».

A **Elodie Baptista** dit « La matinale » pour son aide au cours de mes 6 derniers mois de thèse, notamment vis-à-vis de la gestion de notre colonie de souris. Je te remercie pour la « bonne » ambiance que tu as su mettre dans les bureaux étudiants grâce à tes « traits d'esprits » parfois douteux mais souvent épiques.

A **Morgane, Deborah** et **Ezechiel**, qui sont les trois stagiaires que j'ai encadrés et qui m'ont aidé lors de mes travaux de thèse. J'espère que ces quelques mois passés au laboratoire ont été aussi plaisants pour vous que pour moi et que cela vous a donné l'envie de poursuivre votre carrière dans la recherche.

A tous mes camarades passés et présents des bureaux étudiants : Sajida, Dafné, Paul, Adrien, Allan, Alizée, Cristina, Jordan, Justine, Dima, Madhia, Margaux, Théa, Preeti, Thomas, Romain, Valentine, Charlotte, Laura, Dai et Fatouma. Je tiens à remercier tout particulièrement **Maroua** pour toutes les bonnes discussions que nous avons eu ensemble et pour m'avoir partagé ton expérience de post-doctorante.

A tous les membres du second étage du laboratoire notamment **Nasser, Deborah** et **Jean-Baptiste** pour leur aide.

A **Ghislaine, Nadia, Christelle, Karine** et **Florence** les secrétaires du laboratoire que je remercie de m'avoir beaucoup aidé pour les démarches administratives, notamment pour les déplacements en congrès.

A **Christophe** spécialement, pour toutes les petites choses que tu as régulièrement faites pour moi et les autres étudiants et qui méritent toute ma reconnaissance.

A **Sébastien**, pour l'aide que tu as apporté vis-à-vis du maintien de notre colonie de souris.

A mes amis **Vadym, Jérôme** et **Fabien** pour le soutien qu'ils m'ont apporté lors de la réalisation de cette thèse ainsi que pour tous les bons moments que nous avons passés et que nous passerons ensemble.

A **mes parents et à ma sœur**, pour avoir toujours cru en moi et pour leur soutien indéfectible, même dans les moments les plus difficiles, au cours de ces 3 années passées au laboratoire IMoPA.

# Liste des figures

Figure 1: Les différentes formes de la vitamine K .....	20
Figure 2 : Représentation schématique du cycle canonique de la vitamine .....	23
Figure 3: Représentation schématique du Cycle non-canonique de la vitamine K .....	24
Figure 4 : Mécanisme d'action endocrine de l'ostéocalcine .....	27
Figure 5 : Représentation schématique de la protéine matricielle Gla humaine .....	31
Figure 6 : Les 8 mutations du gène Mgp présentent chez les patients Keutel .....	36
Figure 7 : Les principaux signes cliniques du syndrome de Keutel .....	37
Figure 8 : Représentation schématique de la stratégie d'inactivation du gène Mgp chez la souris .....	38
Figure 9 : Phénotypes vasculaire, trachéo-bronchique et squelettiques des souris mgp ko .....	40
Figure 10 : Mécanismes de la calcification vasculaire .....	43
Figure 11 : Minéralisation de la plaque de croissance en cas de déficience en mgp .....	50
Figure 12 : Origine embryonnaire des éléments squelettiques .....	52
Figure 13 : Les étapes de l'ossification endochondrale .....	54
Figure 14 : Acteurs moléculaires de la régulation de la différenciation ostéoblastique. ....	55
Figure 15 : Les étapes de l'ossification endochondrale lors du développement embryonnaire murin	56
Figure 16 : Boucle de rétro-contrôle Ihh-PTHrP .....	64
Figure 17 : Schéma récapitulatif des gènes impliqués dans l'ossification endochondrale .....	65
Figure 18 : Formation des centres d'ossification secondaires lors du développement postnatal murin .....	68
Figure 19 : Signes cliniques de l'achondroplasie a différents ages .....	70
Figure 20 : Signes Cliniques de la TD de type I .....	71
Figure 21 : Signes cliniques de l'hypochondroplasie .....	73
Figure 22 : Signes cliniques de la pseudoachondroplasie .....	74
Figure 23 : Les 7 sous-familles de FGFs .....	78
Figure 24 : Représentation schématique de la signalisation aux FGFs .....	79
Figure 25 : Impact de la signalisation par FGFR3 sur les chondrocytes lors du développement post- natal .....	81
Figure 26 : Représentation schématique des 3 types d'autophagie présents chez les mammifères....	85
Figure 27 : Mécanismes moléculaires de la macro-autophagie .....	87
Figure 28 : Représentation schématique de la structure du cil primaire .....	93
Figure 29 : Assemblage et désassemblage du cil primaire en coordination avec les phases du cycle cellulaire .....	95
Figure 30 : Transduction de la signalisation Hedgehog médiée par le cil primaire .....	98
Figure 31 : Composition de la matrice extracellulaire du cartilage articulaire .....	106
Figure 32 : Organisation du cartilage articulaire .....	107
Figure 33 : Représentation schématique des altérations articulaires dues à l'apparition d'arthrose.	108
Figure 34 : Représentation schématique des objectifs de la thèse .....	117
Figure 35 : Analyse de l'expression relative d'ARNm de gènes impliqués dans la maturation de la plaque de croissance à 7 jours de vie post-natale. ....	169
Figure 36 : Analyse de l'expression relative d'ARNm de gènes impliqués dans la maturation de la plaque de croissance à 14 jours de vie post-natale. ....	170
Figure 37 : Analyse de l'expression relative d'ARNm de gènes impliqués dans la maturation de la plaque de croissance à 21 jours de vie post-natale. ....	171

Figure 38 : Analyse de l'expression relative de ARNm de gènes impliqués dans la maturation de la plaque de croissance à 28 jours de vie post-natale. ....	172
Figure 39 : Etude de l'impact de la déficience en MGP sur le processus d'autophagie au sein de la plaque de croissance par immunohistochimie.....	174
Figure 40 : Analyse comparative de l'expression génique de chondrocytes primaires WT et MGP KO stimulés avec du FGF2 recombinant .....	184
Figure 41 : Analyse comparative de l'expression génique de chondrocytes primaires WT et MGP KO stimulées avec du FGF18 recombinant .....	186
Figure 42 : Analyse comparative de l'expression génique de chondrocytes primaires WT et MGP KO stimulés avec du BMP2 recombinant.....	189
Figure 43 : Analyse des niveaux protéique des acteurs moléculaires de l'autophagie dans des chondrocytes WT et MGP KO stimules avec du BMP2 recombinant .....	191
Figure 44 : Analyse de l'expression de gènes liés au cil primaire de chondrocytes primaires WT et MGP KO stimulés avec du FGF2, FGF18 ou BMP2 recombinant .....	193
Figure 44 : Evaluation de l'arthrose chez des souris WT ( <i>Mgp<sup>+/+</sup></i> ) et hétérozygotes pour le gène codant MGP ( <i>Mgp<sup>+/-</sup></i> ) AGEES de 18 mois .....	204

## Liste des Tableaux

Tableau 1 : Les 17 membres connus de la famille des protéines vitamines K dépendantes.....	22
Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées pour les expériences de PCR quantitatives .....	133

# Liste des abréviations

<b>ACH</b>	Achondroplasie
<b>ACTL</b>	Anterior cruciate ligament transection
<b>AND</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADAMTS</b>	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
<b>ALK</b>	Activin Receptor-like Kinase
<b>ALP</b>	Alkaline phosphatase
<b>AMBRA1</b>	Autophagy and Beclin 1 regulator 1
<b>AMPK</b>	AMP-activated protein Kinase
<b>ApoE</b>	Apolipoprotéine E
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ATG</b>	Autophagy related protein
<b>ATP8a2</b>	ATPase Phospholipid Transporting 8A2
<b>BECN1</b>	Beclin 1
<b>BGP</b>	Bone Gla protein
<b>BMP</b>	Bone morphogenetic protein
<b>BMPR</b>	Bone morphogenetic protein receptor
<b>CAMKK2/CaMKK<math>\beta</math></b>	Calcium/calmoduline-dependent protein kinase kinase 2 $\beta$
<b>CKD</b>	Chronic kidney disease
<b>CMA</b>	Chaperone mediated autophagy
<b>Coll2/Col2a1</b>	Collagène de type II (sous-unité $\alpha$ 1)
<b>ColIX/Col10a1</b>	Collagène de type X (sous-unité $\alpha$ 1)
<b>COMP</b>	Cartilage Oligomeric Matrix Protein
<b>DAG</b>	Diacylglycerol
<b>DDR2</b>	Discoidin domain receptor tyrosine kinase 2
<b>DMEM</b>	Dulbeco's modified Eagle's medium

<b>DMM</b>	Déstabilisation du ménisque médian
<b>DMP1</b>	Dentin matrix protein 1
<b>DYNC2</b>	Dynesine 2
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor
<b>ELN</b>	Elastin
<b>ERK</b>	Extracellular signal-regulated kinases
<b>EvC</b>	Ellis van-Creveld
<b>FGF</b>	Fibroblast growth factor
<b>FRS2<math>\alpha</math></b>	FGFR substrate 2 $\alpha$
<b>FOX</b>	Forkhead box A
<b>FGFR</b>	Fibroblast growth factor receptor
<b>FSP1</b>	Ferroptosis suppressor protein 1
<b>Gas6</b>	Growth arrest – specific 6
<b>GGCX</b>	$\gamma$ - glutamyl carboxylase
<b>GH</b>	Growth factor
<b>Gla</b>	$\gamma$ -carboxyglutamates
<b>Glu</b>	Glutamate
<b>GRB2</b>	Growth factor receptor-bound 2
<b>GRP</b>	Gla Rich Protein
<b>GSK3</b>	Glycogen synthase kinase 3
<b>HCH</b>	Hypochondroplasie
<b>HDAC</b>	Histone deacetylase
<b>HES</b>	Hematoxylin-Eosin-Safran
<b>HIF</b>	Hypoxia inducible factor
<b>HIS</b>	Hybridation <i>in situ</i>
<b>HSP</b>	Heat shock protein
<b>Hyp</b>	Hypophosphatémie
<b>IBSP1</b>	Bone sialoprotein
<b>IFT</b>	Intraflagellar transport

<b>IGF1</b>	Insulin growth factor 1
<b>IHC</b>	Immunohistochimie
<b>IHH</b>	Indian Hedgehog
<b>IL</b>	Interleukine
<b>IP3</b>	Inositol triphosphate
<b>JNK</b>	Jun N-terminal Kinase
<b>KIF</b>	Kinésine
<b>LAMP2A</b>	Lysosomal associated membrane protein 2A
<b>LC3A/B</b>	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>MD</b>	Ménadione
<b>MGP</b>	Matrix Gla protein/ protéine matricielle Gla
<b>MMP</b>	Matrix metalloproteinase
<b>MPSVII</b>	Mucopolysaccharidose de type VII
<b>MSX2</b>	Msh homeobox 2
<b>MK</b>	Ménaquinone
<b>mTORC</b>	Mammalian target of rapamycin complex
<b>N-CAM</b>	Neural Cell Adhesion Molecule
<b>NKX3.2</b>	NK3 homeobox 2
<b>NRK</b>	Normal Rat Kidney Epithelials cells
<b>OA</b>	Osteoarthritis
<b>OCN</b>	Ostéocalcine
<b>OFD1</b>	Oral-facial-digital type I
<b>OP/SPP1</b>	Osteopontine
<b>OPG</b>	Osteoproteogérine
<b>Osx/sp7</b>	Osterix
<b>PDK</b>	Pyruvate dehydrogenase kinase
<b>PI3K</b>	Phosphoinositide 3-kinase
<b>PK</b>	Phylloquinone

<b>PLC<math>\gamma</math></b>	Phosphoinositide phospholipase C $\gamma$
<b>PRG4</b>	Proteoglycan 4
<b>PRRG/TMG</b>	Proline rich and Gla domain/ Transmembrane Gla protein
<b>PP2a</b>	Protein phosphatase 2
<b>PPi</b>	Pyrophosphate inorganique
<b>PSACH</b>	Pseudoachondroplasie
<b>PTCH1</b>	Patched 1
<b>PtdIns3K</b>	Phosphatidylinositol 3-kinase
<b>PtdIns3P</b>	Phosphatidylinositol-3-phosphate
<b>PTH</b>	Parathyroid hormone/ hormone parathyroïdienne
<b>PTHrP</b>	Parathyroid hormone-related protein
<b>PVKDs</b>	Protéines vitamine K dépendantes
<b>PXE</b>	Pseudoxanthoma elasticum
<b>RAG</b>	Ras-related small GTPases
<b>RANK</b>	Receptor activator of nuclear factor $\kappa$ B
<b>RPS29</b>	Ribosomal protein S29
<b>RUNX</b>	Runt-related transcription factor
<b>SADDAN</b>	Severe achondroplasia with developmental delay and acanthosis nigricans
<b>SHH</b>	Sonic Hedgehog
<b>SH3GLB1</b>	SH3GLB1
<b>SM22</b>	Transgelin
<b>SMED SL-AC</b>	Spondylometaepiphyseal dysplasia short limb-hand type
<b>SMO</b>	Smoothened
<b>SOC</b>	Secondary ossification center
<b>SO/FG</b>	Safranine O/ Fast green
<b>SOS</b>	Synchondrose sphéno-occipitale
<b>SOX</b>	SRY-Box transcription factor 9
<b>SPARC</b>	Secreted acidic cysteine-rich glycoprotein
<b>SQSTM1</b>	Sequestome 1

<b>SUFU</b>	Supressor of fused
<b>ST2</b>	Suppressor of tumorigenicity 2
<b>STAT</b>	Signal Transducers and Activators of Transcription
<b>SUMF1</b>	Sulfatase-modifying factor 1
<b>SVF</b>	Sérum de veau fœtal
<b>T3</b>	Triiodothyronine
<b>TD</b>	Thanatophoric dysplasia
<b>TGFβ</b>	Transforming growth factor β
<b>THRβ1</b>	Thyroid Hormone Receptor β 1
<b>TNAP</b>	Tissue non-specific alkaline phosphatase
<b>TNFα</b>	Tumor necrosis factor α
<b>TRAF6</b>	TNF receptor-associated factor 6
<b>TRAP</b>	Tartrate-resistant acid phosphatase
<b>TUNEL</b>	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
<b>UCMA</b>	Unique Cartilage Matrix-Associated protein
<b>VAM</b>	Vacuolar morphogenesis protein
<b>VEGF-A</b>	Vascular endothelial growth factor A
<b>VKOR</b>	Vitamin K epoxyde reductase
<b>VSMCs</b>	Vascular smooth muscle cells

# Introduction



# 1. Introduction Générale

## 1.1. Les protéines Gla, une famille de protéines vitamine K dépendantes

### 1.1.1. La vitamine K

En 1934, à l'Institut de Biochimie de l'Université de Copenhague, le biochimiste danois Carl Peter Henrik Dam mène des expérimentations visant à prévenir l'apparition de syndromes hémorragiques chez des poulets soumis à un régime appauvri en stérol. Il démontrera que l'administration de graine de chanvre ou de foie de porc permet de prévenir l'apparition de ces hémorragies. Un an plus tard, en 1935, le Dr Dam extraira le principal facteur antihémorragique et anticoagulant à partir de foie de porc. Il nommera alors ce facteur vitamine K pour « *Koagulation* » (Dam et al. 1936).

En 1939, l'équipe du Dr Edward Adelbert Doisy, chimiste américain de l'Université de St Louis (Missouri, USA) seront les premiers à purifier la vitamine K sous ses formes K1 et K2 (Binkley et al., McKee et al., 1939).

Ces travaux permettront à Henrik Dam et Edward Doisy d'obtenir le prix Nobel de Médecine en 1943.

En réalité, le terme vitamine K ne désigne pas une seule molécule, mais une famille de molécules lipophiles qui possèdent une structure similaire. Ces molécules possèdent toutes une base commune, à savoir un noyau 1,4 naphthoquinone avec un groupement méthyl (-CH<sub>3</sub>) en position 2. Elles se distinguent par la présence ou non de chaînes carbonées de types et longueurs variables attachées en position 3 sur le noyau quinone (Figure 1A).

Actuellement, 3 formes de vitamine K ont été identifiées et décrites dans la littérature.

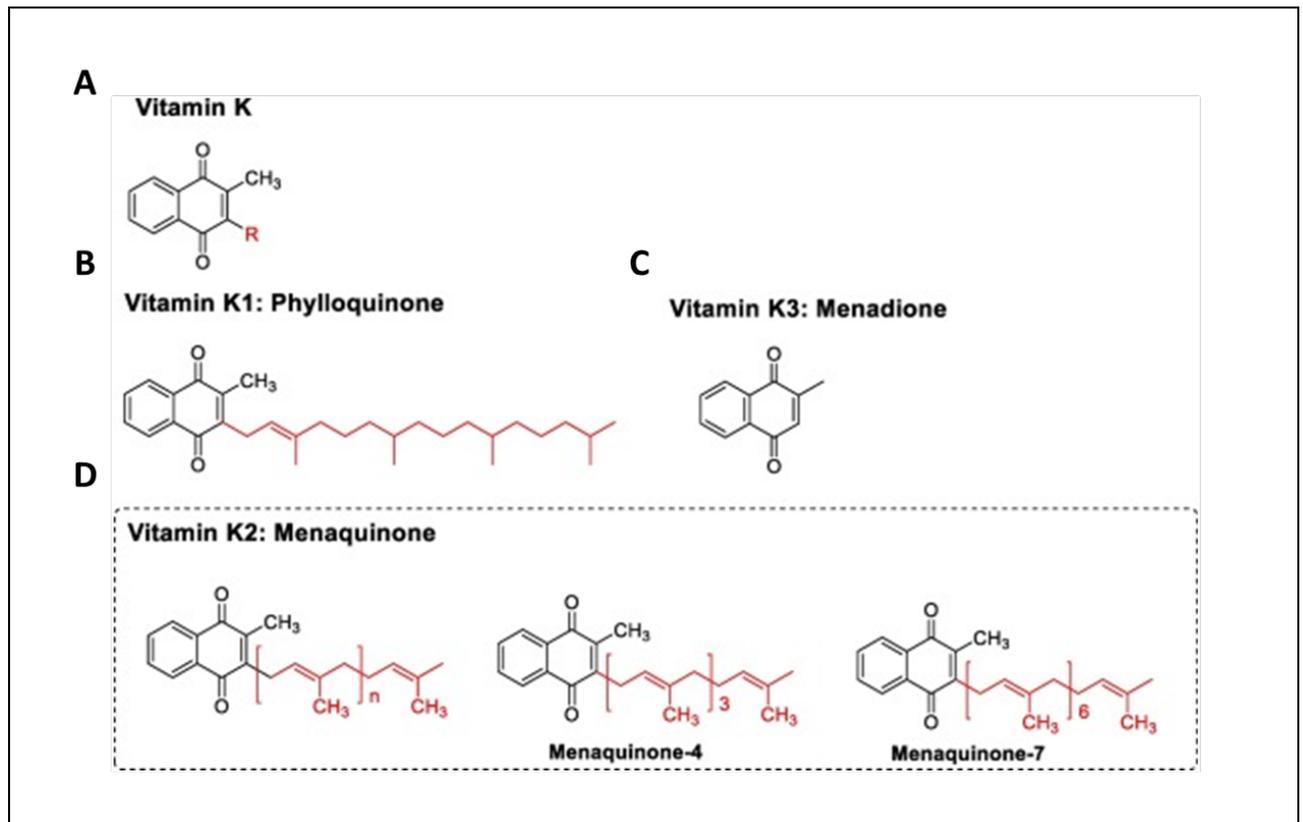
Premièrement, la forme phylloquinone (PK) ou « vitamine K1 » lorsque la chaîne carbonée en position 3 est de type phytane (C<sub>20</sub>H<sub>42</sub>) de la famille des terpènes, hydrocarbures d'origine végétale (Figure 1B). La vitamine K1 est ainsi uniquement produite par les plantes vertes, algues vertes et quelques cyanobactéries, où elle joue un rôle majeur dans la photosynthèse

en tant que transporteur d'électrons (Basset et al., 2016). Elle se retrouve ainsi naturellement et abondamment dans l'alimentation d'origine végétale (légumes, huile...) (Grober et al., 2014).

Ensuite, l'on retrouve les formes de vitamine K nommées ménaquinones (MK) ou « vitamine K2 » où la chaîne carbonée en position 3 correspond à 4-13 répétitions de groupements isoprènes (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>). Les différentes formes sont connues sous la dénomination MK-n, où n désigne le nombre de groupements isoprènes constituant la chaîne latérale (Figure 1D). Les formes de ménaquinones majoritaires sont les formes MK-4 et MK-7, qui possèdent respectivement 4 et 7 répétitions d'isoprènes. Les ménaquinones sont principalement présentes dans l'alimentation d'origine animale (surtout le foie) ou issues de fermentation bactérienne (yaourts, fromages...) (Grober et al., 2014). En plus de l'apport alimentaire, le microbiote intestinal de l'Homme est également capable de produire certaines formes de MK.

Enfin, la dernière forme de vitamine K connue est la forme 2-méthyl-1,4 naphthoquinone, aussi appelée ménadione (MD) ou « vitamine K3 ». Cette forme de la vitamine K est uniquement d'origine synthétique et possède une structure chimique la plus simple car elle est uniquement constituée du noyau naphthoquinone (Figure 1C). La vitamine K3 se distingue ainsi par sa solubilité dans l'eau et par le fait qu'elle ne possède pas d'activité directe sur la coagulation. En effet, la vitamine K3 doit d'abord être convertie en vitamine K1 ou K2 avant de pouvoir agir, elle est ainsi considérée comme une forme précurseur de la vitamine K ou pro-vitamine K (Hirota et al., 2013). Du fait de sa capacité à produire des espèces réactives et de sa cytotoxicité au niveau hépatique et sanguin, elle n'est plus utilisée chez l'Homme depuis la fin des années 1990 (H. Trad and Butterfield., 1994).

La vitamine K, au même titre que les autres molécules lipophiles, sera clivée au niveau du duodénum par l'action des enzymes pancréatiques et formera des micelles avant d'être absorbée au niveau de la bordure en brosse des entérocytes. Les différentes formes de vitamine K seront ensuite transportées vers le foie par des lipoprotéines. Les vitamines K1 et K3 seront alors métabolisées. Plus de la moitié sera excrétée par l'organisme, le reste sera stocké au niveau du foie ou exporté vers d'autres tissus, notamment le cœur et le pancréas. Au contraire, la vitamine K2 restera peu de temps au niveau hépatique et sera rapidement redistribuée vers des tissus périphériques comme le cerveau, le pancréas ou les reins (Beulens et al., 2016 ; Ivanova et al., 2018).



## FIGURE 1: LES DIFFERENTES FORMES DE LA VITAMINE K

A. Noyau 1,4 naphthoquinone présent au niveau de toutes les formes de la vitamine K, un groupement méthyle est lié au carbone en position 2. B. Forme dite « vitamine K1 » ou phylloquinone (PK) qui comporte un noyau naphthoquinone associé à une chaîne carbonée de type phytane (représenté en rouge). C. Forme dite « vitamine K3 » aussi nommée ménadione (MD), au contraire des autres formes, elle est dépourvue de chaîne carbonée en position 3. D. Forme dite « vitamine K2 » dite ménaquinone (MK) qui comporte un noyau naphthoquinone associé à un nombre  $n$  de chaîne isoprène en position 3 (représenté en rouge). A titre d'exemple, les formes MK-4 et 7, formes les plus abondantes qui comportent respectivement 4 et 7 répétitions de groupements isoprènes sont représentées sur ce schéma. Adapté de (Ren et al., 2020).

La principale fonction de la vitamine K est d'agir en tant que cofacteur de l'enzyme nommée  $\gamma$ - glutamyl carboxylase (GGCX). Cette enzyme est requise pour la mise en place de modifications post-traductionnelles indispensables à l'activité de protéines dites « vitamine K dépendantes ».

### 1.1.2. Les protéines Gla

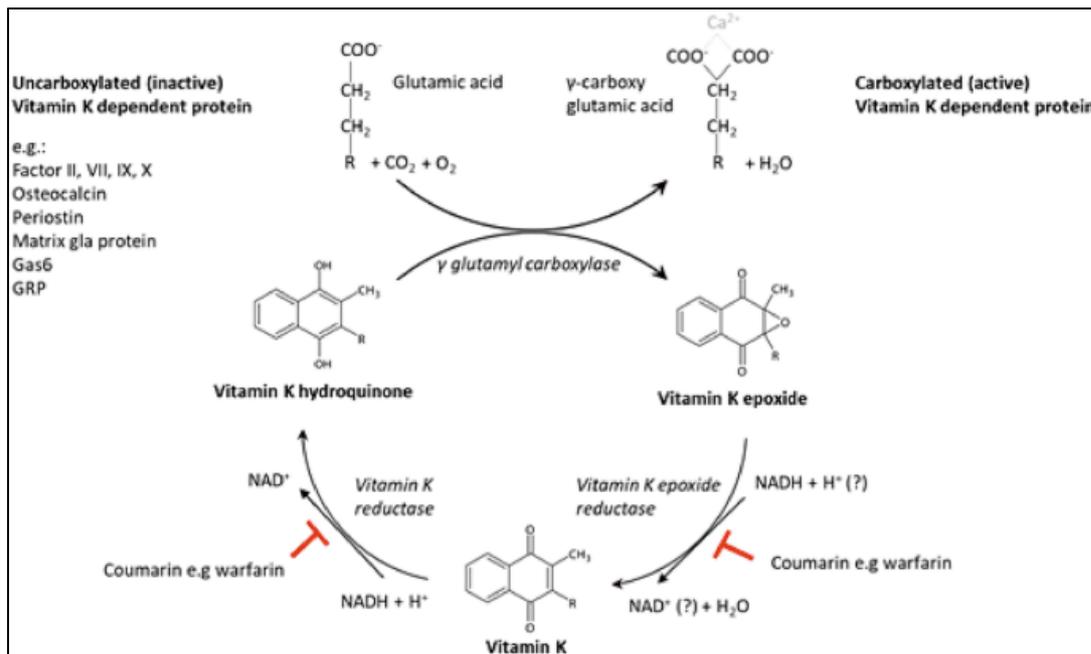
Les protéines vitamine K dépendantes (PVKDs) aussi nommées protéines Gla, constituent une famille de protéines dont 17 membres sont connus à ce jour. La plupart des membres des PVKDs sont impliqués dans la coagulation, tel que les facteurs II, VII, IX et X qui sont pro-coagulation ou encore les protéines C, S ou Z qui sont des anticoagulants. Elles peuvent également jouer un rôle anti-inflammatoire (Gas6, GRP, protéine S), dans la transduction de signaux (PRRG2/TMG2, PRRG4/TMG4, Gas6) ou encore réguler le processus de minéralisation (BGP, MGP, GRP) (Tableau I) (Simes et al., 2020).

Nom	Rôle	Localisation
<b>Prothrombine ou Facteur II</b>	Procoagulant	Hépatique
<b>Proconvertine ou Facteur VII</b>	Procoagulant	Hépatique
<b>Facteur anti-hémophilique B ou Facteur IX</b>	Procoagulant	Hépatique
<b>Facteur de Stuart-Prower ou Facteur X</b>	Procoagulant	Hépatique
<b>Protéine C</b>	Anti-coagulant	Hépatique
<b>Protéine S</b>	Anti-coagulant, anti-inflammatoire, remodelage de l'os	Hépatique
<b>Protéine Z</b>	Anti-coagulant	Hépatique
<b>Growth arrest specific 6 (Gas-6)</b>	Transduction de signaux, régulation de la prolifération cellulaire, migration, adhésion, apoptose, anti-inflammatoire, hémostase	Extra-hépatique
<b>Matrix Gla Protein (MGP)</b>	Inhibition de la calcification, modulateur de l'angiogenèse et de la tumorigenèse, développement squelettique post-natal	Extra-hépatique
<b>Ostéocalcine ou Bone Gla Protein (BGP)</b>	Formation des cristaux d'hydroxyapatite Remodelage des tissus osseux Régulation du métabolisme énergétique	Extra-hépatique
<b>Gla Rich Protein (GRP)</b>	Inhibition de la calcification Anti-inflammatoire	Extra-hépatique
<b>Periostine (isoformes 1 à 4)</b>	Adhésion, prolifération, migration et différenciation	Extra-hépatique

		cellulaire ostéogénèse, angiogénèse	épithéliales,	
<b>Proline rich and Gla domain 1/ Transmembrane Gla protein 1 (PRRG1/TMG1)</b>	Inconnu			Extra-hépatique
<b>Proline rich and Gla domain 2 Transmembrane Gla protein 2 (PRRG2/TMG2)</b>	Transduction de signaux (interaction avec la protéine YAP)			Extra-hépatique
<b>Proline rich and Gla domain 3/ Transmembrane Gla protein 3 (PRRG3/TMG3)</b>	Inconnu			Extra-hépatique
<b>Proline rich and Gla domain 4/ Transmembrane Gla protein 4 (PRRG4/TMG4)</b>	Transduction de signaux (Modulation de ERK2)			Extra-hépatique
<b>Gamma-glutamyl carboxylase (GGCX)</b>	$\gamma$ -glutamyl carboxylation des PVKDs			Réticulum endoplasmique

**Tableau 1 : Les 17 membres connus de la famille des protéines vitamines K dépendantes**

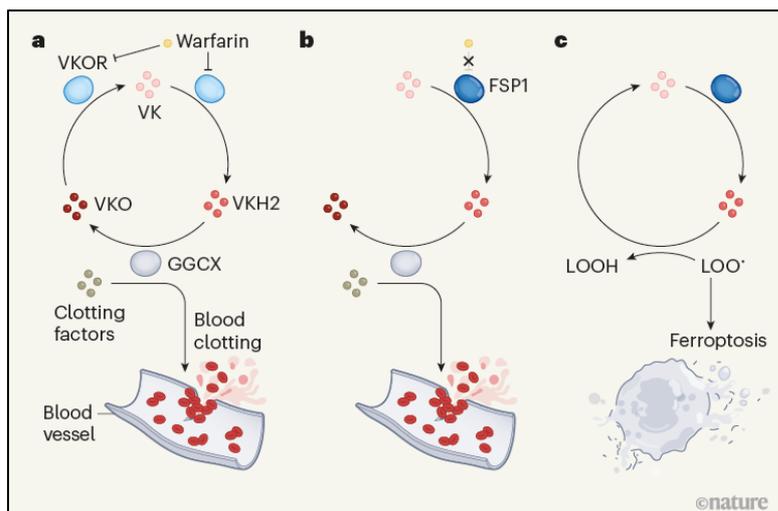
Ces protéines sont caractérisées par la présence de résidus  $\gamma$ -carboxyglutamates (Gla), issus de la modification post-traductionnelle de résidus glutamates (Glu). Cette réaction prend place dans le réticulum endoplasmique, elle est catalysée par la  $\gamma$ -glutamyl carboxylase (GGCX) et nécessite comme cofacteur de la vitamine K sous forme réduite (hydroquinone), de l'oxygène (O<sub>2</sub>) et du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>). La translocation des protéines vitamine K dépendantes vers le réticulum endoplasmique est permise grâce à la présence d'un peptide signal en position N-terminal, qui sera clivé peu après la translocation. En plus de ce peptide signal, un propeptide long de 18 acides aminés est présent au niveau de l'extrémité N-terminale des PKVDs (Pan et al., 1985 ; Stanley et al., 1999). Ce propeptide est indispensable pour que la  $\gamma$ -glutamyl carboxylase reconnaisse et se fixe à sa cible, il sera clivé après la modification post-traductionnelle de la protéine, avec comme exception la MGP, qui le conservera dans sa forme mature (Vermeer et al., 1990, Schrugers et al., 2008, Parker et al., 2014). Ensuite, l'énergie nécessaire à la réaction de  $\gamma$ -glutamyl carboxylation est obtenue grâce à l'oxydation de la vitamine K hydroquinone en vitamine K 2,3-époxyde. La forme époxyde de la vitamine K sera ensuite recyclée en hydroquinone par deux étapes de réduction successives, catalysées respectivement par la vitamine K époxyde réductase (VKOR) et par la vitamine K quinone réductase (Figure 2) (Schrugers et al, 2008 ; Grober et al, 2014 ; Alonso et al., 2020).



**FIGURE 2 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU CYCLE CANONIQUE DE LA VITAMINE**

La vitamine K sous sa forme réduite dite « hydroquinone » est utilisée comme cofacteur de l'enzyme  $\gamma$ -glutamyl carboxylase afin de mettre en place les modifications post-traductionnelles des protéines Gla. Durant cette réaction, la vitamine K sera oxydée pour aboutir à la forme « époxyde » qui sera recyclée au travers de deux étapes de réduction successives. La première étape de réduction est réalisée grâce à l'action de la Vitamine K epoxide reductase, ce qui permet de obtenir la forme classique de la vitamine K. La seconde étape de réduction est réalisée par la vitamine K reductase qui permettra d'obtenir de nouveau de la vitamine K sous forme hydroquinone. Adapté de (Alonso et al., 2022).

De très récentes études ont démontré l'existence d'un cycle non canonique de la vitamine K. En effet, en plus de son rôle dans la coagulation, la vitamine K présenterait également une activité anti-ferroptose. Brièvement, la ferroptose est une forme de mort cellulaire non apoptotique et dépendante du fer, due à l'accumulation de radicaux lipidiques (Dixon et al., 2012). Il a été démontré que la protéine suppresseur de ferroptose 1 (FSP1) était capable de réduire la vitamine K de manière analogue aux vitamines K réductases. La vitamine K hydroquinone ainsi formée est capable de supprimer les radicaux lipidiques responsable de la mort cellulaire par ferroptose (Mishima et al., 2022) (Figure 3).



**FIGURE 3: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU CYCLE NON-CANONIQUE DE LA VITAMINE K**

A. Cycle canonique de la vitamine K (cf. Figure 2) qui va permettre la mise en place des modifications post-traductionnelles et donc l'activité des protéines de la famille Gla, dont la plupart sont impliquées dans le processus de coagulation du sang. B. L'enzyme FSP1 est capable de réduire la vitamine K sous sa forme hydroquinone (VKH2) et donc de favoriser l'activité des protéines Gla et la coagulation du sang en dehors du cycle canonique. C. La production de la VKH2 par l'enzyme FSP1 va également permettre l'élimination des peroxydes lipidiques (LOO•) qui sont impliqués dans la mort des cellules par ferroptose. La VKH2 va permettre la réduction des peroxydes pour donner des hydro-peroxydes lipidiques (LOOH) et sera recyclée sous sa forme de vitamine K classique. Adapté de (Ward & DeNicol, 2022).

Le cycle de la vitamine K est un processus fondamental pour le maintien de l'homéostasie cellulaire. Une dérégulation de ce processus peut ainsi avoir de graves conséquences.

La warfarine, de la famille des coumarines, est un inhibiteur compétitif des vitamine K réductases qui est principalement utilisé en médecine dans les thérapies anticoagulantes (Grober et al ; 2014). Cependant, des excès de prise de warfarine peuvent entraîner des conséquences désastreuses chez l'Homme : nausées, vomissements, de sévères hémorragies, voir des nécroses de la peau (Patel et al., 2022). Les conséquences d'une prise excessive de warfarine sont exacerbées chez le rongeur, où la prise de warfarine peut entraîner la mort du fait d'une dérégulation sévère du processus de coagulation sanguine. De plus, il a été montré que la warfarine peut engendrer l'apparition de calcifications artérielles chez le rat (Price et al., 1998). Ceci explique son utilisation passée comme rodenticide, mais le développement de

résistances chez les rongeurs, notamment dues à des mutations des vitamine K réductases, a rendu caduc son emploi (Pelz et al., 2005).

Le cycle de la vitamine K non canonique n'est pas affecté par la warfarine et est même un mécanisme indispensable pour contrebalancer ses effets indésirables. En effet, il a été observé que chez des souris empoisonnées à la warfarine, l'action de la protéine FSP1 était indispensable pour empêcher des hémorragies cérébrales léthales (Mishima et al., 2022).

Le maintien des cycles canonique et non-canonique de la vitamine K est donc indispensable à l'activité des protéines Gla. Au sein de cette famille, l'ostéocalcine (BGP), la protéine matricielle Gla (MGP) et la protéine riche en résidus Gla (GRP) se distinguent par leur rôle de régulateur du processus de minéralisation.

## 1.2. Les protéines Gla impliquées dans la minéralisation

### 1.2.1. L'ostéocalcine (BGP)

L'ostéocalcine (OCN) ou Bone Gla Protein (BGP) est la première protéine vitamine K dépendante impliquée dans la minéralisation à avoir été découverte et est sans aucun doute la plus connue et la plus étudiée. Elle fut découverte en 1976 par l'équipe américaine du Dr Paul Price, il s'agit de la protéine non collagénique la plus abondante dans l'os (Price et al., 1976). L'ostéocalcine est une petite protéine constituée de 46 à 50 acides aminés selon l'espèce (Patti et al., 2013) qui possède 3 résidus Gla et un pont disulfure formé par les résidus cystéines 23 et 29. La séquence de l'ostéocalcine, tout particulièrement au niveau de la région centrale contenant les résidus Gla ainsi que les deux cystéines est bien conservée au sein du phylum des Vertébrés (Down et al., 2003 ; Laizé et al., 2005 ; Patti et al., 2013).

Le gène humain codant l'ostéocalcine se nomme *BGLAP*. Il est localisé au niveau du locus 1q25-q31 et est exprimé par les ostéoblastes, les chondrocytes hypertrophiques, les odontoblastes (dentine) et par les cémentoblastes (cément dentaire) (Bronckers et al., 1998 ; Zoch et al., 2016). L'expression du gène *BGLAP* aboutit à la synthèse d'une forme précurseur de l'ostéocalcine, la pré-ostéocalcine, composée de 98 acides aminés chez l'Homme et qui subira plusieurs modifications post-traductionnelles dans le réticulum endoplasmique.

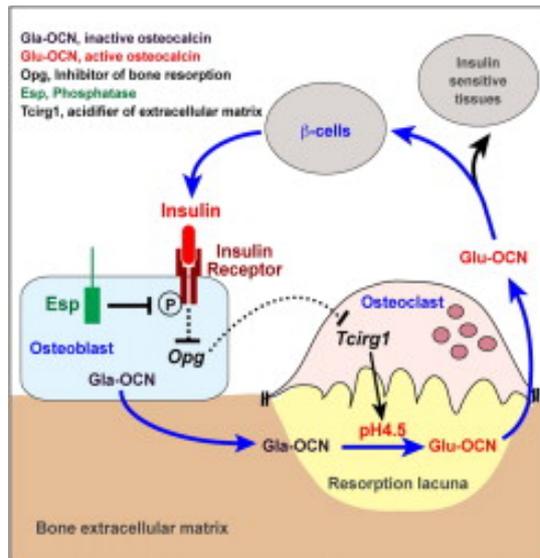
Comme expliqué dans la partie 1.1.2 de l'introduction, la translocation des PVKDs dans le réticulum endoplasmique se fera à l'aide d'un peptide signal, qui sera rapidement clivé par l'action d'une protéase, ce qui aboutira à la formation de la pro-ostéocalcine, composée de 75 acides aminés. Les résidus glutamates en position 17, 21 et 24 seront ensuite  $\gamma$ -carboxylés ou non par l'action de la GGX aboutissant à une pro-ostéocalcine sous forme décarboxylée ou carboxylée. Indépendamment de la  $\gamma$ -glutamyl carboxylation, l'ostéocalcine sera de nouveau clivée pour produire une ostéocalcine décarboxylée ou carboxylée mature, puis finalement sécrétée dans la matrice extracellulaire (Pan et al., 1985 ; Patti et al., 2003 ; Zoch et al., 2016).

La présence des résidus Gla chargés négativement, permettent l'interaction avec les ions  $Ca^{2+}$  qui sont présents en abondance dans la matrice osseuse. (Price et al., 1976, Otawara et al., 1986). Des analyses structurales par résonance magnétique nucléaire ont démontré que l'ostéocalcine est capable de changer de conformation de sorte à favoriser l'interaction entre ses résidus Gla et le calcium. En absence de calcium, la structure de l'apo-ostéocalcine est complètement désorganisée (Down et al., 2003).

Par sa capacité à capter le calcium, il a rapidement été proposé que l'ostéocalcine serait capable de réguler la minéralisation osseuse. Afin de mieux comprendre son rôle dans le processus de minéralisation, un modèle de souris BGP knockout a été généré. Les souris BGP KO naissent sans développer d'anomalies squelettiques. Cependant, une augmentation anormale de la densité osseuse a été observée au cours du vieillissement. Cette augmentation de la densité osseuse s'explique par une augmentation de la formation de l'os sans altération du processus de résorption (Ducy et al., 1996). Cette étude a permis de mettre en évidence le rôle de l'ostéocalcine en tant qu'inhibiteur de la formation osseuse.

De plus, des études complémentaires sur les souris BGP KO ont également démontré, pour la première fois, que les tissus squelettiques pouvaient réguler le métabolisme énergétique par voie endocrine. En effet, il a été observé que les souris BGP KO présentaient une hyperglycémie, une hypo-insulinémie, une insulino-résistance et de l'obésité (Lee et al., 2007). Le mécanisme d'action proposé est que la résorption de l'os par les ostéoclastes entraîne la production massive d'ostéocalcine décarboxylée et son relargage dans la circulation sanguine. L'ostéocalcine décarboxylée jouera un rôle d'hormone et ira stimuler la production d'insuline par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans pancréatiques et la production d'adiponectine par

les adipocytes. L'adiponectine stimulera également la production d'insuline, qui se fixera sur les récepteurs à insuline des ostéoblastes (IR), ce qui va inhiber le gène codant pour l'ostéoprotégérine (OPG), une protéine inhibitrice de l'activité des ostéoclastes. Ceci va favoriser l'acidification de la matrice osseuse et finalement, le relargage d'encore plus d'ostéocalcine décarboxylée, formant ainsi une boucle de rétrocontrôle positif (Figure 4) (Ferron et al., 2010 ; Ferron et al., 2012 ; Wei et Karsenty., 2015).



**FIGURE 4 : MÉCANISME D'ACTION ENDOCRINE DE L'OSTEOCALCINE**

*Les ostéoblastes sont capables de produire l'ostéocalcine sous sa forme active (Gla-OCN). L'activité de résorption du tissu osseux des ostéoclastes induit une acidification du milieu qui va entraîner une décarboxylation de l'ostéocalcine (Glu-OCN). La forme décarboxylée de l'ostéocalcine est capable de passer dans la circulation sanguine et d'aller stimuler la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans pancréatiques. L'insuline va ensuite aller se fixer aux niveaux de récepteurs présents à la surface des ostéoblastes. La fixation de l'insuline à son récepteur va entraîner l'inhibition du gène *Opg*, protéine inhibitrice de l'activité des ostéoclastes, notamment au travers de l'inhibition du gène *Tcirg1* (T Cell Immune Regulator 1, ATPase H<sup>+</sup> Transporting VO Subunit A3) qui entraîne l'acidification du milieu extracellulaire. Ceci va alors favoriser la décarboxylation d'encore plus d'ostéocalcine créant ainsi une boucle de rétrocontrôle positif. Adapté de (Ferron et al., 2010).*

Le rôle endocriné de l'ostéocalcine ne semble pas uniquement affecter le métabolisme du glucose. D'autres études indiquent que l'ostéocalcine jouerait par exemple un rôle dans la fertilité masculine. La forme décarboxylée de l'ostéocalcine est en effet capable de stimuler les cellules de Leydig pour qu'elles produisent plus de testostérone (Kanazawa et al., 2012)

De plus, l'ostéocalcine semble également jouer un rôle dans le maintien de la masse musculaire lors du vieillissement (Mera et al., 2016).

Plus récemment, il a été démontré que l'ostéocalcine est requise pour le développement cérébral de l'embryon. L'ostéocalcine d'origine maternelle, du fait de sa petite taille, est capable de passer au travers de la membrane placentaire et de la membrane hémato-encéphalique pour s'accumuler dans le thalamus, l'hypothalamus et le tronc cérébral, afin de réguler la synthèse et la signalisation de différents neurotransmetteurs (Oury et al., 2013 ; Shang et al., 2019).

Finalement, l'ostéocalcine semble jouer un rôle protecteur contre le développement de la maladie de Parkinson et est donc une molécule thérapeutique potentielle contre les maladies neuro-dégénératives (Guo et al., 2018).

### ***1.2.2. La Gla Rich protein (GRP)***

En 2008, l'équipe du Dr Surmann-Schmitt identifie une nouvelle protéine exprimée dans le cartilage et qui semble être impliquée dans le développement squelettique. Cette protéine sera alors nommée UCMA pour *Unique Cartilage Matrix-Associated Protein*. De manière concomitante, l'équipe de chercheurs portugais du Dr Carla Viegas identifient la même protéine et caractérisent en plus la présence de nombreux résidus Gla en son sein. Ainsi, la protéine sera renommée Gla Rich Protein (GRP) (Surmann-Schmitt et al., 2008 ; Viegas et al., 2008).

La GRP est principalement exprimé au niveau du cartilage, de l'os, de la peau et dans la paroi des vaisseaux sanguins (Surmann-Schmitt et al., 2008, Viegas et al., 2008 ; Viegas et al., 2009). La GRP est une petite protéine constituée de 74 acides aminés dont 15 sont des résidus Gla. Ainsi GRP est la protéine connue qui possède le plus de  $\gamma$ -glutamyl carboxylations. Comme les autres PVKDs (cf. partie 1.1.2 de l'introduction), la GRP est synthétisée sous forme de précurseur de 135 acides aminés de long, qui présente un peptide signal et un propeptide au niveau de son extrémité N-terminale. La GRP est caractérisée par la présence d'un site de clivage protéolytique de séquence AXXF au sein du propeptide, d'un domaine

d'oligomérisation coil-coiled et à l'instar de la BGP, un pont disulfure intramoléculaire formé par deux cystéines (Surmann-Schmitt et al., 2008 ; Viegas et al., 2008).

Bien que le(s) rôle(s) de la GRP reste encore à déterminer, de nombreuses hypothèses ont été formulées vis-à-vis de son lien avec la minéralisation. Ces hypothèses se basent sur sa proximité structurale avec l'ostéocalcine et sa richesse en résidus Gla, qui lui permettent d'interagir avec les ions calciques. Premièrement, il a été observé que la GRP s'accumulait dans les sites de calcifications pathologiques présent chez les patients présentant une calcification de la peau (Pseudoxanthoma elasticum, PXE), dermatomyosite associée à des calcinoses) ou de leurs vaisseaux sanguins (maladies rénales chroniques, CKD). (Viegas et al., 2009). De faibles niveau de GRP circulante ont également été associés à l'apparition de calcifications artérielles chez les patients atteints de CKD (Silva et al., 2020). La GRP jouerait donc le rôle d'inhibiteur de la calcification vasculaires, en liant les ions  $Ca^{2+}$  et les cristaux calciques grâce à ces résidus Gla. La forme décarboxylée de la GRP (dcGRP) n'est en effet pas capable de prévenir l'apparition de calcifications pathologiques. La GRP fait également partie d'un complexe inhibiteur de la calcification, dans lequel se retrouve la fetuine A et une autre PVKD : MGP (Viegas et al., 2015). Il a également été montré que GRP est capable d'inhiber la voie de signalisation BMP2-SMAD 1/5/8, qui est impliquée dans la calcification des cellulaires musculaires lisses de la paroi artérielle (Wilems et al., 2017).

La GRP semble également posséder des propriétés anti-inflammatoires qui ne sont pas directement dépendantes de ces résidus Gla. En effet, les formes carboxylée et décarboxylée de la GRP sont toutes deux capables de diminuer la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$ , dans les cellules du système immunitaire (Viegas et al., 2017).

La GRP a aussi été associée au développement du squelette. Cette protéine serait impliquée dans l'organisation et le maintien de la matrice cartilagineuse du fait de sa grande affinité pour les collagènes de type II, IX et XI et de sa capacité à inhiber les agrécanases ADAMTS 4 et 5 (Surmann et al., 2008 ; Eitzinger et al., 2012). Des expériences sur des lignée de pré-ostéoblastes et sur des cultures primaires de chondrocytes murins indiquent que la GRP serait capable de réguler la balance chondrogenèse/ostéogenèse en inhibant la différenciation ostéogénique de cellules précurseurs présentes à l'interface os/cartilage chez le fœtus (Surmann-Schmitt et A l., 2008). De plus, GRP est une cible des facteurs de transcription Runx2 et Sp7 (Ostérix) et semble stimuler la différenciation des ostéoblastes. (Lee et al., 2015). Enfin,

l'inhibition du gène *grp1* chez le poisson zèbre conduit à un retard de croissance et à de graves malformations squelettiques, surtout au niveau crânio-facial (Neascu et al., 2011).

Finalement, des études ont également montré un lien entre GRP et l'arthrose. Tout d'abord, une étude transcriptomique, menée sur des souris ayant développé une arthrose post-traumatique à la suite d'une déstabilisation du ménisque médian (DMM) a montré une augmentation de l'expression du gène codant pour la GRP avec le temps (Loeser et al., 2013). Des études cliniques ont démontré une accumulation de la forme décarboxylée de GRP dans les sites de calcifications pathologiques présents au niveau du cartilage et de la membrane synoviale des patients atteints d'arthrose (Rafael et al., 2014). Par l'utilisation d'un modèle cellulaire de l'arthrose, il a été démontré que la forme carboxylée de la GRP est capable d'inhiber la mise en place de calcifications pathologiques et que les deux formes diminuent l'expression de plusieurs cytokines pro-inflammatoires (Cavaco et al., 2016 ; Okuyan et al., 2020).

Le rôle de la GRP lors du développement d'arthrose n'est pas cantonné uniquement au cartilage. En effet, il a également été démontré que des modèles d'arthrose liée au vieillissement développés chez des souris déficientes en GRP présentaient une formation d'ostéophytes plus faible ainsi qu'un os sous-chondral moins épais (Eitzinger et al., 2012).

L'augmentation de l'expression de la GRP observée lors de la mise en place de l'arthrose semble ainsi être un mécanisme de protection contre la calcification et l'inflammation des articulations. Ceci fait de la GRP une nouvelle cible moléculaire prometteuse dans le développement de traitement contre l'arthrose.

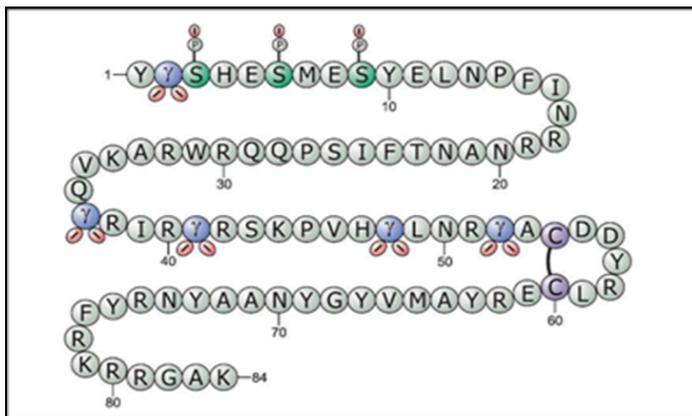
En conclusion, l'ostéocalcine est un membre de la famille des protéines Gla qui est connu depuis plusieurs années pour son rôle majeur dans le remodelage du tissu osseux. A l'inverse, la GRP est un membre des PVKDs qui a été identifié plus récemment et dont le rôle dans le développement squelettique reste mal caractérisé.

De manière similaire, MGP est un membre de la famille des protéines Gla qui, par l'utilisation de modèles animaux, a été montré comme impliquée dans le processus de minéralisation au niveau vasculaire et cartilagineux (Luo et al., 1997). Cependant, à l'heure actuelle, ses mécanismes d'action demeurent mal compris.

## 2. La protéine matricielle Gla (MGP)

### 2.1. Découverte et caractéristiques de MGP

En 1983, Paul Price et son équipe identifient une nouvelle petite protéine comportant plusieurs résidus Gla dans de la matrice osseuse d'origine bovine. Elle sera alors nommée protéine matricielle Gla ou Matrix Gla Protein (MGP) (Price et al., 1983). D'autres équipes démontreront que la MGP est également exprimé au niveau du cartilage chez plusieurs espèces (Hale et al., 1988 ; Price et al., 1994 ; Cancela et al., 2001). MGP est également exprimée au niveau du système respiratoire (poumons et trachée), du système cardiovasculaire (cœur, paroi artérielle), des reins, de la rate, de l'utérus, du ciment dentaire et des yeux (Frazer & Price 1988 ; Luo et al., 1995 ; Wallin et al 1999 ; Cario-Toumaniantz et al 2007 ; Hashimoto et al., 2001 ; Tomarev et al., 2003). La structure primaire de la protéine sera déterminée en 1985, par la même équipe à l'origine de sa découverte. (Price and Williamson., 1985). Il s'agit d'une petite protéine composée de 84 acides aminés chez l'Homme. Elle comporte 5 résidus Gla (4 chez la souris) en position 2, 37, 41, 48 et 52 et 3 résidus sérine phosphorylés en position 3, 6 et 9. Comme chez la BGP et la GRP, un pont disulfure intramoléculaire est présent et est formé par l'interaction entre les résidus cystéines en position 54 et 60 (Figure 5) (Price et al., 1985 ; Hale et al., 1988 ; Price et al., 1994).



**FIGURE 5 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA PROTEINE MATRICIELLE GLA HUMAINE**

Sur ce schéma, les 5 résidus  $\gamma$ -carboxyglutamates (Gla) en position 2,37, 41, 48 et 52 sont représentés en bleu, les résidus sérine phosphorylés en position 3,6 et 9 sont représentés en vert et les deux cystéines en position 54 et 60, qui forment un pont disulfure intramoléculaire sont représentées en violet. Adapté de (Schurgers et al., 2008).

De même que les autres PVKDs, elle est synthétisée sous forme de précurseur qui comporte un peptide signal nécessaire à sa translocation dans le réticulum endoplasmique (cf. partie 1.1.2 de l'introduction). Mais à l'inverse des autres PVKDs, elle ne possède pas le propeptide de 18 acides aminés au niveau de son extrémité N-terminale. Cependant, une séquence homologue est présente dans la forme mature de MGP et est localisée entre les résidus 15 et 30. De même, MGP se distingue des autres PVKDs, par la présence du site de reconnaissance par la  $\gamma$ -carboxylase au niveau de sa moitié N-terminale. De plus, au niveau de cette partie N-terminale, la forme mature de MGP comporte un domaine de phosphorylation (SxxSxxS) et un site de clivage ANxF qui se retrouve chez toutes les espèces étudiées. Enfin, un autre site de clivage contenant deux résidus arginine (RR) ou un résidu arginine et une glycine (RG) sont localisés au niveau de son extrémité C-terminale. Des études suggèrent que ce site de clivage est requis pour permettre à MGP d'assurer sa fonction (Price et al., 1987 ; Laizé et al., 2005 ; Cancela et al., 2014).

La présence de ces modifications post-traductionnelles dote la protéine matricielle Gla de caractéristiques particulières.

A l'instar de BGP et GRP, les résidus Gla permettent à MGP d'interagir avec les ions calciques. MGP est également capable de lier les cristaux d'hydroxyapatite afin de réguler le processus de minéralisation de la matrice extracellulaire (Price et Faus., 1998 ; Hackeng et al., 2001 ; O'Young et al., 2011). Ainsi, il a été observé que la forme décarboxylée de MGP (dcMGP, GluMGP) s'accumule au niveau des sites de calcifications pathologiques (Schurgers et al., 2007). Grâce à ces résidus Gla, MGP est également capable d'interagir et d'inhiber l'action de la Bone Morphogenic Protein (BMP2), une protéine impliquée dans la calcification artérielle et dans le développement squelettique (Bostrom et al., 2001 ; Zebboudj et al., 2001). La présence d'une proline en position 64 permet également à MGP d'interagir avec BMP4, une autre protéine impliquée dans la calcification artérielle. L'interaction avec BMP4 ne nécessite que la présence d'un résidu Gla de part et d'autre de la proline, soit seulement deux des 5 résidus. L'interaction entre les BMP et le calcium ne s'excluent donc pas l'un de l'autre. (Yao et al., 2006). Ces propriétés font de MGP un inhibiteur majeur de la calcification dans de nombreux tissus (cf. partie 2.4 de l'introduction).

Les sérines phosphorylées sont également indispensables à la fonction de MGP. Les trois sérines sont contenues dans le motif SxxSxxS et seront phosphorylées par l'action d'une

caséine kinase présente dans l'appareil de Golgi. Il est fortement suggéré que ces phosphorylations régulent la sécrétion de MGP. En effet, il a été démontré que dans les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMCs), la forme non phosphorylée de MGP n'est que partiellement sécrétée et s'accumule dans le cytosol, là où la forme phosphorylée est correctement sécrétée dans la matrice (Price et al., 1994 ; Wajih et al., 2004). D'autres études indiquent que les phosphorylations seraient requises pour que MGP puisse inhiber le processus de minéralisation bien que leur rôle exact ne soit pas encore connu (Schurgers et al., 2007). Les résidus sérines seraient également requis pour permettre l'interaction avec l'élastine et prévenir la calcification de la lamina élastique artérielle (Parashar et al., 2021). De très récentes études menées sur des modèles murins exprimant des formes mutées de MGP ont montré que ces résidus sérines sont indispensables à l'action anti-minéralisante de MGP au niveau vasculaire lorsque les souris sont soumises à un régime standard. A l'inverse, les résidus Gla sont impliqués dans la fonction de MGP au niveau vasculaire uniquement lorsque les animaux sont soumis à un régime riche en phosphate induisant l'apparition de calcification vasculaire. Des résultats préliminaires obtenus par spectrométrie de masse suggèrent même que les résidus sérines seraient requis pour la mise en place des résidus Gla par l'action de la GGCX (Parashar et al., 2022). Ces résultats récents apportent de nouvelles questions quant aux rôles respectifs et la relation qui existent entre les modifications post-traductionnelles de MGP.

En 1990, le gène codant pour MGP sera identifié chez l'Homme au niveau du chromosome 12p12.3-13.1 (Cancela et al., 1990). Le gène *Mgp* comporte 3,9 kb et comporte 4 exons séparés par trois longs introns, qui représentent plus de 80% de la séquence. Des études plus récentes ont démontré l'existence d'un cinquième exon, situé entre les exons 1 et 2, il n'a pour l'instant été retrouvé que dans certains tissus de primates (Cancela et al., 2014).

L'expression du gène codant la MGP est modulée par différents mécanismes moléculaires. La voie de signalisation aux Fibroblasts Growth Factors (FGFs) régule l'expression de MGP.

En effet, il a été démontré que FGF2 stimule l'expression de MGP dans les chondrocytes prolifératifs (Stheneur et al., 2003). L'acide rétinoïque a été montré comme capable d'induire l'expression de MGP au niveau d'ostéoblastes, de fibroblastes et de chondrocytes articulaires d'origine humaine (Cancela et al., 1992). A l'inverse, l'acide rétinoïque diminue l'expression de MGP au niveau des VSMCs chez le rat (Farzaneh-Far et al., 2001). L'hormone de croissance

(Growth Hormone, GH) régule négativement l'expression de MGP dans les chondrocytes prolifératifs, par l'intermédiaire de l'Insulin like Growth Factor 1 (IGF1) (Stheneur et al., 2003). C'est également le cas de l'Epidermal Growth factor (EGF) qui diminue significativement l'expression de MGP dans la lignée cellulaire NRK (Normal Rat Kidney Epithelial cells) (Cancela et al., 1997). L'hormone parathyroïde (PTH) régule aussi l'expression de MGP via les facteurs de transcription RUNX2, SP1 et SP3 (Suttamanatwong et al., 2009). Des études récentes suggèrent également une régulation de l'expression de MGP via des mécanismes épigénétiques (Tiago et al., 2016 ; Tuo and Ye, 2017). Enfin, il a également été montré dans la lignée cellulaire ostéoblastiques MC3T3-E1, que le phosphate inorganique stimule l'expression de MGP par la voie ERK1/2-Fra1 et que la présence de calcium est requise pour induire cette stimulation (Julien et al., 2007, 2009 ; Koshniat et al., 2011).

En conclusion, MGP est une protéine de petite taille dont l'expression est finement régulée et qui présente des modifications post-traductionnelles (résidus Gla et sérine phosphorylés) qui lui permettent d'inhiber le développement de calcifications anormales. Ce rôle majeur que joue MGP dans la minéralisation a été confirmé chez l'Homme, où des mutations perte-de-fonction du gène codant pour MGP conduisent à l'apparition d'une maladie génétique caractérisée par des calcifications anormales de nombreux tissus, qui se nomme Syndrome de Keutel (Munroe et al., 1999).

## 2.2. Le syndrome de Keutel

Le syndrome de Keutel est une maladie génétique autosomale récessive découverte en 1971 par Jurgen Keutel (Keutel et al., 1971). Il s'agit d'une maladie extrêmement rare, en effet, seuls 43 cas cliniques ont été identifiés à ce jour, la majorité d'entre eux sont originaires de pays du Moyen et Proche-Orient (Cancela et al., 2021 ; Shabaniyan et al., 2022).

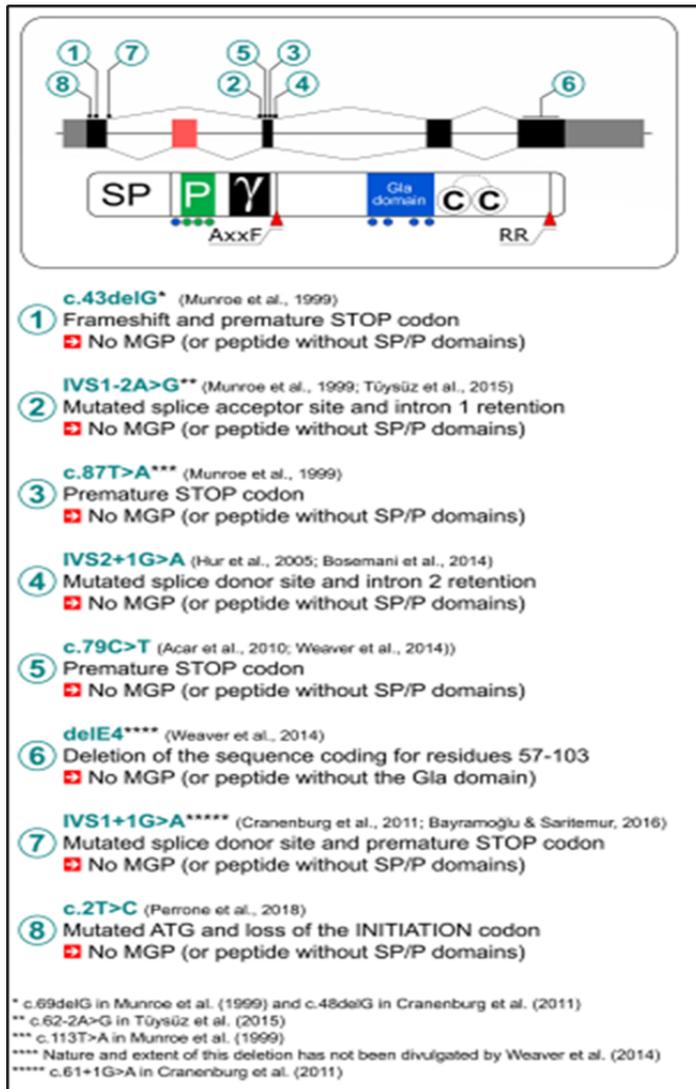
Le syndrome de Keutel est une maladie due à des mutations perte-de-fonction au niveau du gène codant pour MGP. A ce jour 8 mutations différentes du gène *MGP* ont été identifiées chez les patients Keutel (Figure 6).

De plus, le syndrome de Keutel est une maladie à pénétrance variable et à variabilité phénotypique intra-familiale. Ainsi les signes cliniques présentés par les patients Keutel, tout comme leur sévérité et leur occurrence, sont extrêmement variables.

Les patients Keutel présentent ainsi une grande diversité de signes cliniques, dont certains sont communs avec d'autres pathologies, telle que la Chondrodysplasie ponctuée dominante liée à l'X (aussi appelée Syndrome de Conradi-Hünemann-Happle), le syndrome oto-palato-digital ou le syndrome de Zellweger, ce qui a potentiellement conduit à de nombreux diagnostics erronés. Ceci pourrait expliquer, au moins partiellement, le faible nombre de patients identifiés.

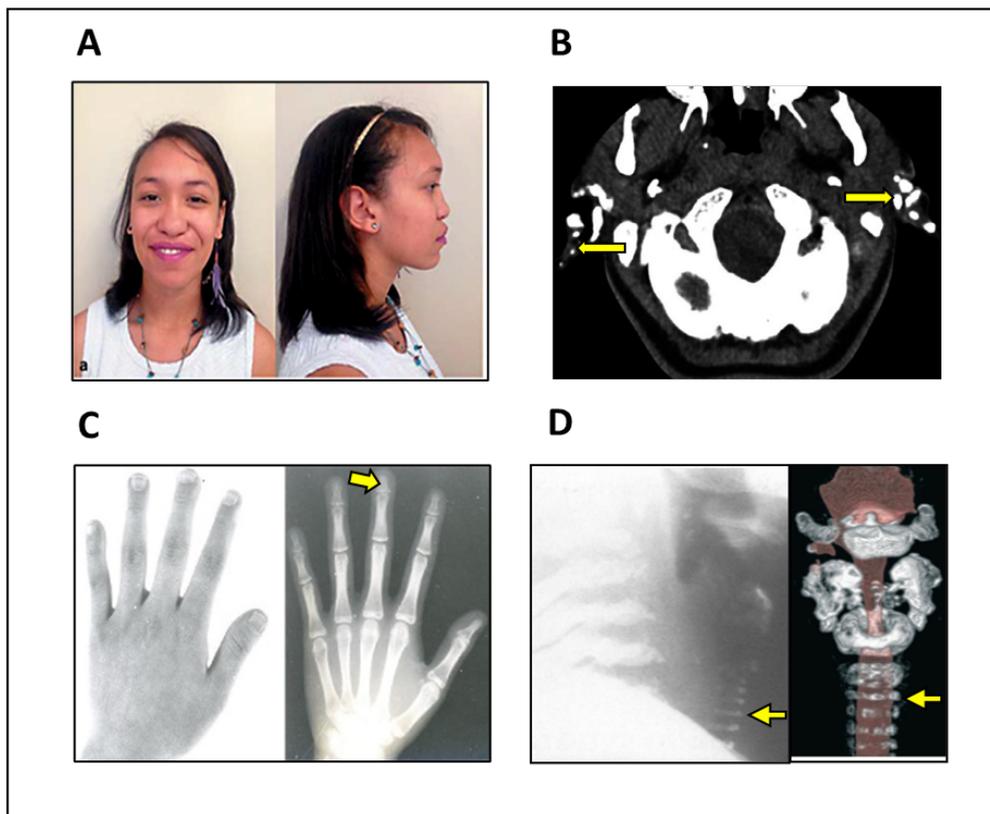
Les signes cliniques retrouvés dans la grande majorité des patients Keutel sont les dysmorphies faciales (hypoplasie médio-faciale, inclinaison de la partie antérieure du front, arête nasale élargie, réduction des ailes nasales), des calcifications anormales de certains cartilages (cartilages nasaux, auriculaires, costaux et des voies respiratoires) et le brachytéléphalangisme (réduction et élargissement des phalanges terminales des doigts et des orteils) (Figure 7).

Les patients Keutel peuvent également présenter une perte d'audition uni- ou bilatérale (modérée à sévère), des sténoses pulmonaires périphériques (rétrécissement de la valve pulmonaire située au niveau du ventricule droit), un retard de croissance, une déficience mentale ou encore des problèmes respiratoires (infections respiratoires fréquentes, dyspnées, toux). Dans des cas isolés, il a été observé que les patients Keutel pouvaient présenter des otites/sinusites, des malocclusions dentaires, des problèmes cardiovasculaires, voir même des crises d'épilepsie ou des convulsions. (Teebi et al., 1998 ; Munroe et al., 1999 ; Hur et al., 2005 ; Khosroshahi et al., 2014 ; Perrone et al., 2018 ; Cancela et al., 2021).



**FIGURE 6 : LES 8 MUTATIONS DU GENE MGP PRESENTENT CHEZ LES PATIENTS KEUTEL**

A ce jour 8 mutations différentes ont été identifiées chez les patients atteints du syndrome de Keutel. 7 de ces mutations sont localisées dans les deux premiers exons du gène Mgp, 1 seule est située au niveau de l'exon 4. La plupart de ces mutations induisent des formes tronquées de la protéine qui ne possèdent pas le peptide signal (SP) et le domaine phosphorylé (P) par la mise en place d'un codon stop prématuré et/ou d'altération des sites d'épissages. La mutation 6 induit une forme tronquée de la protéine, qui ne possède pas le domaine Gla du fait de la délétion d'une partie de la séquence codant du gène Mgp. La dernière mutation identifiée, quant à elle, impacte le codon d'initiation et conduit également à une forme de la protéine ne possédant pas les domaines SP et P. Adapté de (Cancela et al., 2021).



**FIGURE 7 : LES PRINCIPAUX SIGNES CLINIQUES DU SYNDROME DE KEUTEL**

A. *Dysmorphisme crânio-facial (i.e. hypoplasie médio-faciale) caractéristique du syndrome de Keutel observé chez une patiente brésilienne âgée de 13 ans.* B. *Imagerie CT cranial d'un patient Keutel indiquant une calcification anormale des cartilages auriculaires (flèches jaunes).* C. *Radiographie antéropostérieure de la main gauche d'un patient Keutel indiquant un raccourcissement et un épaissement (i.e. brachytéléphalangisme) des phalanges terminales (flèche jaune).* D. *Radiographie latérale et reconstruction 3D à partir d'image de  $\mu$ CT de la trachée de patients Keutel indiquant des calcifications pathologiques des anneaux cartilagineux (flèches jaunes).* Adapté de (Cranenburg et al., 2011 ; Khosroshahi et al., 2014 ; Perrone et al., 2018 ; Girit et al., 2019).

Dans de très rares cas, des calcifications artérielles ont pu être observées au niveau rénal, hépatiques, crânial/cérébral, dans les artères coronaires et dans l'aorte. (Teebi et al., 1998 ; Cranenburg et al., 2011 ; Ayyildiz et al., 2012 ; Bosemani et al., 2014 ; Weaver et al., 2014).

Enfin, après l'âge de 30 ans, les patients Keutel peuvent développer des lésions au niveau de la peau et de l'alopecie. (Devriendt et al., 1999 ; Meier et al., 2001 ; Hur et al., 2005 ; Nanda et al., 2006 ; Acar et al., 2010)

L'espérance de vie des patients Keutel dépend essentiellement de la sévérité des symptômes respiratoires. Elle est considérée comme non atteinte dans la majorité des cas.

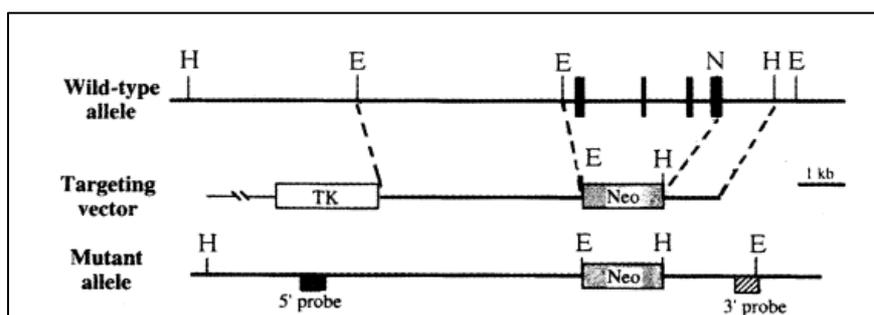
Actuellement, il n'existe aucun traitement dédié au syndrome de Keutel. En effet, les seuls traitements disponibles sont symptomatiques, comme l'utilisation d'antibiotiques et de bronchodilatateurs pour traiter les symptômes respiratoires ou encore la prescription d'anti-hypertenseurs (Devriendt et al., 1999 ; Meier et al., 2001 ; Özdemir et al., 2006 ; Girit and Senol, 2019).

Un modèle animal expérimental a été développé afin de mieux comprendre les mécanismes d'action de la protéine matricielle Gla et *in fine* développer des traitements contre le syndrome de Keutel.

### 2.3. Modèle expérimental animal : les souris *Mgp*<sup>-/-</sup>

Le modèle de souris déficientes en MGP, les souris *Mgp*<sup>-/-</sup> (ou MGP KO) ont été générées à la fin des années 90 par l'équipe du Dr Gérard Karsenty.

Afin de générer ce modèle, l'équipe du Dr Karsenty a réalisé un criblage génétique dans des cellules souches embryonnaires murine. Dans ces cellules, une cassette néomycine PGK Neo a été insérée pour remplacer une portion de 3,4 kb du gène codant la MGP qui contient la région du promoteur, les exons 1, 2, 3 et une partie de l'exon 4 sur l'un des allèles (Figure 8) (Luo et al., 1997).



**FIGURE 8 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRATEGIE D'INACTIVATION DU GENE MGP CHEZ LA SOURIS**

Délétion de 3,4 Kb de la séquence codante du gène *Mgp* par insertion d'une cassette néomycine PGK-Neo (marqueur de sélection positif) au niveau du gène *Mgp* dans des cellules souches embryonnaires murines. La cassette d'expression de thymidine kinase MC1-TK a été utilisée comme marqueur de sélection négatif. Adapté de (Luo et al., 1997).

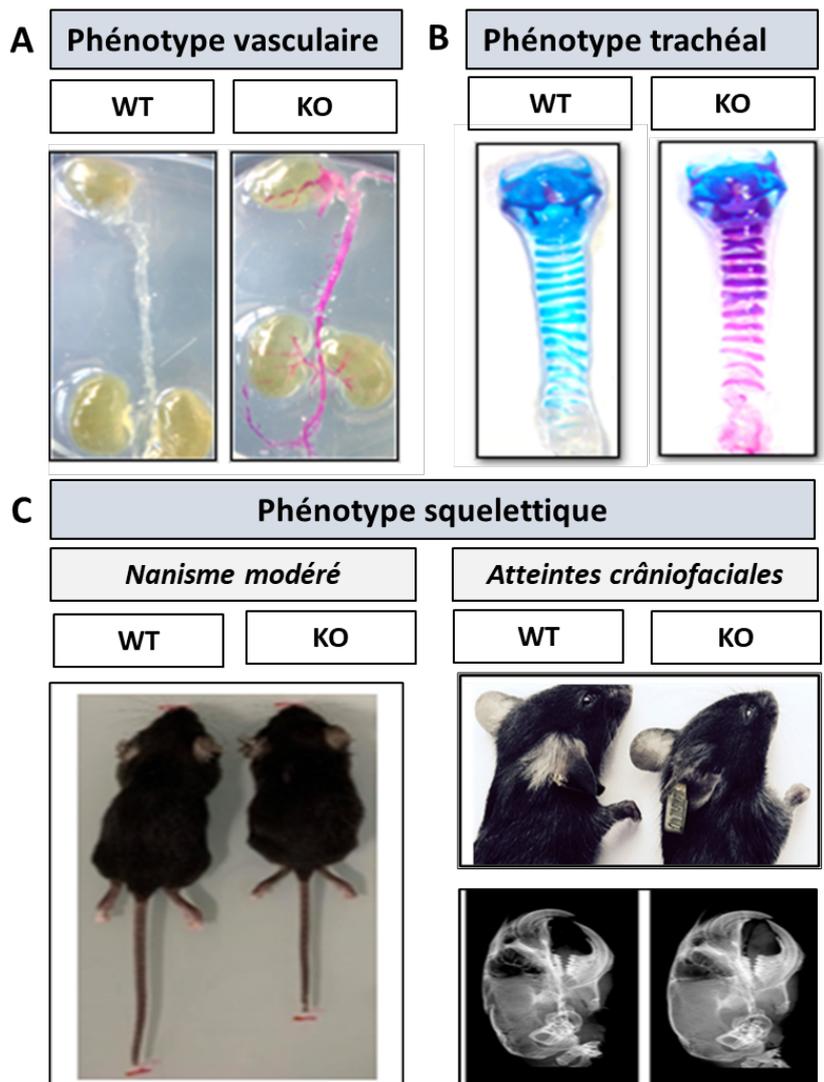
Du fait de la létalité précoce des souris *Mgp*<sup>-/-</sup> entre 2 et 8 semaines de vie, c'est-à-dire peu de temps avant d'atteindre maturité sexuelle, celles-ci ne peuvent être obtenues que par la reproduction de souris hétérozygotes (*Mgp*<sup>+/-</sup>), en accord avec la distribution mendélienne classique des allèles.

Ces souris déficientes en MGP reproduisent, de manière exacerbée, les phénotypes squelettique, respiratoire et vasculaire observés chez les patients Keutel.

Premièrement, des études ont montré que ces souris *Mgp*<sup>-/-</sup> développaient des calcifications aortiques spontanées et extensives. Ces calcifications aortiques se mettent en place à partir de 4 jours de vie post-natale (P4) au niveau de l'arc aortique, puis progressent de manière rostro-caudale jusqu'à aboutir à une calcification massive de l'ensemble du tronc aortique et de ses ramifications. Ce sont ces calcifications artérielles massives qui sont responsables de la mort prématurée des souris entre 2 et 8 semaines de vie du fait d'une rupture de l'aorte et une hémorragie interne (Figure 9A) (Luo et al., 1997 ; Leroux-Berger et al., 2011).

Deuxièmement, il a été observé que ces souris présentaient une calcification des anneaux cartilagineux trachéo-bronchiques. (Luo et al., 1997). Des études menées par l'équipe du laboratoire d'accueil et non publiées ont montré que les anneaux trachéaux des souris *Mgp*<sup>-/-</sup> minéralisaient précocement par rapport aux souris contrôles (Figure 9B).

Ensuite, les souris déficientes en MGP développent un nanisme modéré après 3 semaines de vie post-natale (Figure 9C) (Luo et al., 1997 ; Laurent et al., 2022). De manière concomitante, ces souris développent également une ostéopénie, c'est-à-dire une réduction modérée de leur densité minérale osseuse (Luo et al., 1997 ; Laurent et al., 2022). Il s'agit là d'un véritable paradoxe compte tenu des propriétés de MGP (cf. partie 2.1 de l'introduction) comme inhibiteur de minéralisation. Enfin, les souris déficientes en MGP présentent des dysmorphies crânio-faciales. En effet, il a été observé que les souris déficientes en MGP présentaient une hypoplasie médio-faciale associée à une sévère malocclusion dentaire, du fait d'une réduction significative de la taille des maxillaires, du palais et d'une diminution modérée de la taille des mandibules, sans altérations des autres éléments du crâne (Figure 9C) (Marulanda et al., 2017).



**FIGURE 9 : PHENOTYPES VASCULAIRE, TRACHEO-BRONCHIQUE ET SQUELETTIQUES DES SOURIS MGP KO**

A. Colorations au Rouge Alizarine du tronc aortique (cœur inclus) des souris WT et MGP KO au stade P21. B. Coloration au Bleu Alcian et au Rouge Alizarine du tissu trachéal de souris WT et MGP KO à P21. C. Comparaison de la longueur corporelle totale des souris WT et MGP KO au stade P28 et étude du dysmorphisme cranio facial par imagerie CT au stade P35. Adapté de (Luo et al., 1997 ; Marulanda et al., 2017).

En conclusion, à l'instar des patients Keutel, les souris déficientes en MGP se caractérisent par l'apparition de calcifications anormales qui conduisent soit directement soit indirectement à l'apparition de phénotypes vasculaires, respiratoires et squelettiques.

De plus, ce modèle murin a permis de mettre en évidence le fait que la régulation de la minéralisation par MGP diffère selon les tissus qui l'expriment. En effet, il apparaît que MGP joue un rôle prépondérant dans l'inhibition des calcifications artérielles, de par le phénotype

vasculaire létale présenté par les souris MGP KO. Son rôle au niveau du squelette apparaît comme moins clairement défini et semble différer entre le tissu cartilagineux et l'os.

Ainsi des études plus approfondies ont été menées afin de mieux caractériser le rôle tissu-dépendant que joue MGP dans la régulation de la minéralisation.

## 2.4. MGP : Un inhibiteur de la calcification

### 2.4.1. MGP et le tissu cardio-vasculaire

Les calcifications vasculaires correspondent à la déposition de minéraux, sous forme de complexes phosphocalciques, dans la paroi artérielle. Ce processus prend place au cours du vieillissement normal mais peut se retrouver accéléré et exacerbé par certaines pathologies telles que les maladies rénales chroniques, le diabète, l'athérosclérose, l'hypertension ou encore certaines maladies génétiques comme le syndrome de Keutel (Wu et al., 2013).

Les calcifications vasculaires peuvent se distinguer en deux catégories selon la couche de la paroi vasculaire qui est impactée.

Premièrement, il existe des calcifications de l'intima, zone de la paroi des vaisseaux sanguins principalement composée de cellules endothéliales. Les plaques d'athérosclérose, principales causes de calcifications intimes, se développent à la suite d'une inflammation chronique de l'intima ce qui conduira à l'accumulation de dépôts lipidiques et de cellules immunitaires, puis enfin à l'apparition de calcifications.

Deuxièmement, il existe des calcifications de la média, zone de la paroi des vaisseaux sanguins principalement composée de fibres élastiques et de cellules musculaires lisses (CMLVs). Il s'agit du type de calcifications retrouvées chez les souris déficientes en MGP (Luo et al., 1997).

Les calcifications vasculaires peuvent être initiées par différents mécanismes (Figure 10).

Premièrement, chez des espèces telles que l'Homme ou la souris, il a été observé que des inhibiteurs de la formation de cristaux d'hydroxyapatite, tels que le pyrophosphate, le complexe fetuin/ $\alpha$ 2-HS-glycoprotéine ou l'ostéopontine (OPN) sont exprimés au niveau

vasculaire. Ainsi la perte de fonction de l'un ou plusieurs de ces inhibiteurs favorise la mise en place de calcifications artérielles.

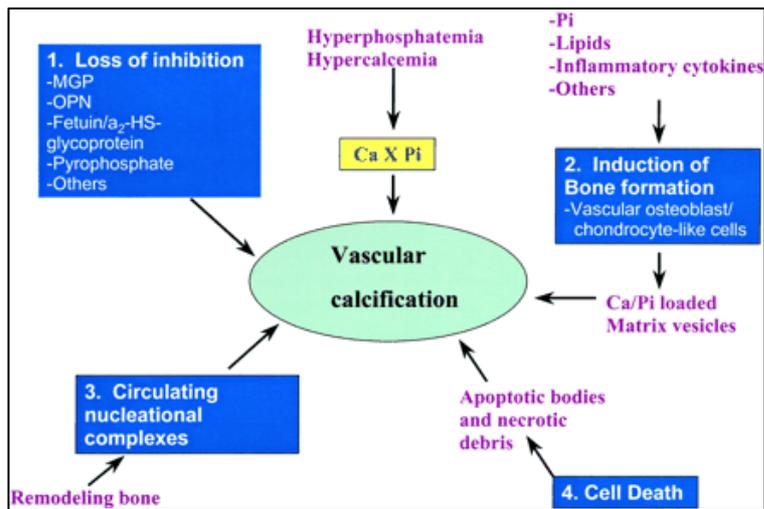
Deuxièmement, il a été montré que les cellules musculaires lisses vasculaires sont capables de se trans-différencier en cellules de type chondro/ostéogéniques sous l'influence de différents facteurs génétiques ou environnementaux. Parmi ces facteurs génétiques, on retrouve RUNX2, qui est capable d'induire l'expression d'autres gènes ostéogéniques tels que l'ostéopontine (OP, SPP1), Ostérix, la bone sialo protein (IBSP1), le collagène de type I ou l'alkaline phosphatase (ALP). De même, SOX9, un facteur de transcription chondrogénique est également impliqué dans la modification du phénotype des cellules musculaires lisses (Shioi et al., 2002 ; Moe et al., 2002 ; Moe et al., 2003 ; Lin et al., 2015 ; Augstein et al., 2018). D'autres études ont également montré une expression des gènes de la famille des Bone Morphogenetic Protein (BMPs) qui appartiennent à la superfamille des Transforming Growth factor (TGF- $\beta$ ) au sein d'artères calcifiées. (Bostrom et al., 1993). Ainsi BMP2 et BMP4 sembleraient promouvoir la transdifférenciation des VSMCs, et à l'opposé BMP7 inhiberait cette différenciation (Yao et al., 2010).

Troisièmement, il est proposé que l'axe os-vasculaire est impliqué dans le développement de ces calcifications par le relargage de complexes protéiques circulants (Price et al., 2001, 2002).

Enfin, il a été montré que la mort des cellules entraîne l'apparition de débris membranaires riches en phospholipides et de corps apoptotiques qui favorisent la mise en place de cristaux d'hydroxyapatite. Ceci est notamment vrai lorsque les cellules meurent par nécrose ou apoptose lors du développement de plaques d'athéroscléroses. De plus, il a été observé que les souris *ApoE*<sup>-/-</sup>, souris qui développent spontanément des plaques d'athérosclérose, présentent une surexpression de *Sox9* qui semblent favoriser la mort cellulaire lors de la progression de la pathologie (Proudfoot et al., 2000 ; Augstein et al., 2018).

La calcification artérielle est donc un processus complexe, régulé par de nombreux mécanismes moléculaires parmi lesquels MGP semble avoir une place importante.

Ainsi, plusieurs études ont été menées et continuent d'être menées afin de comprendre le rôle de MGP au sein de ce processus complexe.



**FIGURE 10 : MECANISMES DE LA CALCIFICATION VASCULAIRE**

1. « Perte de l'inhibition » causée par la déficience d'un ou plusieurs inhibiteurs constitutivement actifs, résultant en la minéralisation de la matrice extracellulaire vasculaire. 2. Induction de la formation de tissu-ostéocartilagineux au niveau vasculaire par le changement de phénotype des cellules musculaires lisses. 3. Relargage de complexes de nucléation circulant du fait du remodelage du tissu osseux. 4. Mise en place de débris cellulaires à la suite de la mort des cellules de la paroi des vaisseaux sanguins par apoptose ou nécrose ce qui va favoriser le développement de corps apoptotiques. Adapté de (Giachelli et al., 2004).

Tout d'abord, une étude combinant approche expérimentale et simulation informatique suggère que MGP pourrait inhiber la mise en place des calcifications vasculaires par une interaction directe avec les cristaux d'hydroxyapatite (O'Young et al., 2022).

D'autres études indiquent que la protéine matricielle Gla serait également en mesure d'inhiber la transition osteo/chondrogenique des CMLVs.

Il a ainsi été démontré que les souris déficientes en MGP présentent de nombreuses cellules chondrocytes-like au niveau de leur aorte (El-Maadawy et al., 2003). Une autre équipe a également montré que ces cellules proviennent de CMLVs et qu'elles surexpriment le facteur de transcription RUNX2 (Speer et al., 2009).

De plus, comme indiqué dans la partie 2.1, MGP est capable de lier et d'antagoniser l'action pro-calcifiante de BMP2, il a ainsi été suggéré que l'effet inhibiteur de MGP pourrait passer par la régulation de la voie des BMPs. Cette hypothèse est confortée par les travaux de l'équipe du Dr Bostrom qui ont démontré, chez des souris *Mgp*<sup>-/-</sup>; *ApoE*<sup>-/-</sup>, une diminution

des niveaux de p-SMAD 1/5/8 au niveau des lésions athérosclérotiques. Inversement, la surexpression de MGP au niveau vasculaire conduit à une diminution de l'expression de *BMP2*, de l'expression des gènes *VEGF* (Vascular Endothelial Growth Factor) et *ALK1* (Activin Like Kinase receptor 1) qui favorise la néo angiogenèse et *in fine* la formation de lésions athérosclérotiques. Ensuite, l'utilisation de l'inhibiteur de *BMP2*, nommé LDN- 193189, chez les souris *Mgp*<sup>-/-</sup> aboutit à une réduction des calcifications médiales aortiques. Cependant, chez les souris *Mgp*<sup>-/-</sup>, aucune augmentation du niveau d'expression de *BMP2* n'a pu être observé au niveau de l'aorte (Yao et al., 2010 ; Malhotra et al., 2015). Il a également été montré qu'au niveau des cellules endothéliales, la protéine matricielle Gla est capable de réguler l'activité de *BMP4* via une boucle de rétrocontrôle négatif impliquant *ALK1* (Yao et al., 2006).

La protéine matricielle Gla est également capable d'interagir avec des composants de la matrice extracellulaire, ce qui pourrait être un autre moyen de réguler le processus de calcification. En effet, la protéine matricielle Gla peut fixer la vitronectine et la fibronectine via son extrémité C-terminale, molécule capable d'initier des calcifications vasculaires par l'induction de l'expression de gènes chondro/ostéogéniques au niveau des CMLVs (Nishimoto et al., 2005 ; Nishimoto et al., 2014 ; Ding et al., 2006).

MGP est également capable de se lier avec un autre composant extracellulaire, l'élastine, un substrat pour la formation de cristaux calciques. En effet, il a été montré que la lamelle élastique d'aorte dévitalisée provenant de rat est capable de calcifier dans des conditions spécifiques de culture (Price et al., 2006). Ensuite, il a été observé que les souris déficientes en MGP et haplo-insuffisantes en élastine, les souris *Mgp*<sup>-/-</sup> ; *Eln*<sup>+/-</sup> présentent une réduction des calcifications au niveau artériels comparées aux souris *Mgp*<sup>-/-</sup> (Khavandgar et al., 2014). Plus récemment, il a été montré qu'un peptide N-terminal généré à partir de la partie N-terminale de MGP et contenant les 3 sérines phosphorylées, est capable d'inhiber la minéralisation des fibres élastiques dans un modèle *in vitro* (Parashar et al., 2021).

La réexpression de MGP au niveau vasculaire chez des souris *Mgp*<sup>-/-</sup> ; *SM22-Mgp* permet d'inhiber la minéralisation anormale de la lamina élastique mais n'est cependant pas suffisante pour prévenir celle des éléments cartilagineux. De même la restauration de l'expression de MGP au niveau hépatique chez des souris *Mgp*<sup>-/-</sup> ; *ApoE-Mgp* ne permet pas d'empêcher le développement de calcification vasculaire. Ces résultats démontrent ainsi que

MGP est uniquement capable de réguler la minéralisation vasculaire de manière locale (Murshed et al., 2004).

De plus, il est important de noter que seule la forme active, c'est-à-dire la forme phosphorylée et carboxylée de la protéine (p-cMGP) est capable d'inhiber les calcifications artérielles pathologiques. En conditions stressantes ou lors de déficience en vitamine K, la forme décarboxylée va s'accumuler (p-ucMGP et dp-ucMGP) (Schrugers et al., 2007). La forme phosphorylée et décarboxylée (p-ucMGP) s'accumule au niveau des sites de calcifications vasculaires. La forme sans aucune modification post-traductionnelle (dp-ucMGP) présente peu ou pas d'affinité avec le calcium et sera donc plus présente dans la circulation sanguine. Des niveaux sanguins élevés de la forme dp-ucMGP sont associés à une déficience en vitamine K et à des maladies impliquant des calcifications artérielles. Cette forme pourrait donc être un biomarqueur pour détecter des calcifications vasculaires et plus généralement de risques cardio-vasculaires chez les patients (Schurgers et al., 2007 ; Delanaye et al., 2014 ; Wei et 2018 ; Griffin et al., 2019).

Comme indiqué précédemment, de très récentes études sur des modèles murins présentant des mutations spécifiques des résidus d'acides aminés de MGP modifiés post-traductionnellement ont permis d'apporter des précisions quant à leurs fonctions respectives. Ainsi, en conditions normales, seuls les résidus sérine phosphorylés sont requis pour l'inhibition des calcifications artérielles. Cependant en conditions pathologiques, les résidus Gla et les résidus sérine phosphorylés sont tous deux nécessaires pour l'inhibition des calcifications vasculaires (Parashar et al., 2022).

Ceci pourrait alors expliquer les observations antérieures quant à l'association des formes de MGP sans modifications post-traductionnelles et le développement de calcifications artérielles.

En plus de son rôle dans la régulation de la calcification artérielle, plusieurs études ont montré que MGP est également capable de réguler l'apparition de calcifications au niveau de la valve aortique humaine. Il est proposé que MGP inhibe l'activité pro-calcifiante médiée par le TNF $\alpha$  et BMP2 au niveau des cellules interstitielles humaine de la valve aortique (Venardos et al., 2015 ; Chiyoya et al., 2018).

De même, il est intéressant de noter qu'au-delà de la mise en place de calcification vasculaires et valvulaires, la déficience en MGP conduit également à l'apparition de malformations artérioveineuses chez la souris. Il est proposé que ces malformations seraient dues, au moins en partie au rôle de MGP dans la régulation de la balance entre activité des BMPs et de la voie Notch (Yao et al., 2011, 2013). De plus, une étude récente a montré une accumulation des formes non phosphorylées et non carboxylées de MGP au niveau des veines de patients atteints de varices (Gheorghe et al., 2021).

En conclusion, au sein de cette régulation complexe, la protéine matricielle Gla apparaît comme un facteur clé qui est impliqué dans plusieurs mécanismes connus pour induire des calcifications artérielles. Cette implication de MGP à différents niveaux pourrait être une des explications quant à la gravité du phénotype vasculaire observé chez les souris MGP KO. A l'inverse, les mutations du gène *MGP* que l'on retrouve chez l'Homme conduisent à une forme tronquée de la protéine qui est suspectée d'avoir une activité résiduelle. Ceci pourrait alors expliquer la disparité entre les phénotypes vasculaires humains et murins.

Cependant, le tissu cardio-vasculaire n'est pas le seul type dans lequel MGP régule les calcifications.

#### *2.4.2. MGP et le tissu ostéo-cartilagineux*

##### **A. LE CARTILAGE TRACHEO-BRONCHIQUE**

Comme indiqué auparavant, les souris MGP KO et les patients atteints du syndrome de Keutel présentent des calcifications anormales au niveau des cartilages trachéo-bronchiques qui sont associés à des problèmes respiratoires.

La première description de la minéralisation du cartilage trachéal a été réalisée chez le rat en 1974 (Bonucci et al., 1974). Par la suite, des observations similaires ont été réalisées par l'équipe d'accueil chez des souris de fond génétique C57BL/6J.

Tout comme les calcifications artérielles, la minéralisation de l'arbre trachéo-bronchique est un processus qui prend place au cours du vieillissement. Ces calcifications s'observent chez les patients âgés de plus de 40 ans et sont asymptomatiques dans la grande majorité des cas,

bien que certains patients présentent des atteintes respiratoires (dyspnée, sifflements respiratoires, stridor) (Moncada et al., 1992). La minéralisation des anneaux cartilagineux débute au niveau médio-ventrale et suit ensuite l'axe céphalo-caudal (Tohno et al., 1999).

La trachéopathie chondro-ostéoplastique (Tracheobronchopathia Osteochondroplastica) est une pathologie, autre que le syndrome de Keutel, qui implique la mise en place de calcifications au niveau du cartilage trachéo-bronchique. Dans le cas de cette pathologie, il s'agit de la mise en place de nodules sous-muqueux de type osseux ou cartilagineux au niveau de la partie antérolatérale de la trachée (Silveira et al., 2016). Il est intéressant de noter que BMP2 semble jouer un rôle clé dans la formation de ces nodules, puisqu'il est fortement exprimé au niveau des cellules mésenchymateuses avoisinant les nodules (Tajima et al., 1997).

Des traitements à la warfarine sont également capables d'induire une minéralisation de la trachée (Moncada et al., 1992). C'est le cas lors des embryopathies dues à la warfarine (Abbott et al., 1977). Il existe ainsi un lien entre le cycle de la vitamine K et l'apparition de calcifications trachéo-bronchiques. Actuellement, la cause de ces calcifications demeure inconnue, la plupart des hypothèses proposent un rôle régulateur par les protéines Gla et donc que le traitement à la warfarine inhiberait leur activité (Joshi et al., 2000).

Ainsi, les souris WT développeront également des calcifications trachéo-bronchiques mais à des stades du développement post-natal plus avancés, contrairement aux autres phénotypes (vasculaires et squelettiques) qui ne se développent pas chez eux. Comme indiqué dans la partie 2.3, des études menées par l'équipe d'accueil ont démontré que les souris *Mgp*<sup>-/-</sup> présentent une minéralisation accélérée de leur anneaux cartilagineux trachéo-bronchiques par rapport aux souris WT.

A l'heure actuelle, le rôle exact de MGP dans le processus de calcifications trachéo-bronchique reste encore mal caractérisé. Il est cependant envisageable, notamment vis-à-vis des observations faites sur d'autres pathologies proches, que le rôle de MGP dans la régulation de BMP2 puisse expliquer le phénotype trachéal observé chez les souris MGP KO.

Des études dans le cadre d'un projet européen sont actuellement menées au sein du laboratoire d'accueil afin de mieux caractériser le rôle de MGP au sein du tissu trachéo-bronchique.

Comme discuté auparavant, les anneaux cartilagineux de l'arbre trachéo-bronchique ne sont pas les seuls éléments cartilagineux impactés en cas de déficience en MGP.

## B. LE CARTILAGE NASAL

Il y a quelques années, une étude s'est proposée d'étudier le rôle de MGP dans le développement crânio-facial afin de mettre en évidence les mécanismes derrière le développement d'hypoplasies médio-faciales chez les patients Keutel et les souris MGP KO.

Cette étude a montré que les souris *Mgp*<sup>-/-</sup> présentaient une minéralisation précoce (détectable dès la fin de la première semaine de vie post-natale) du septum nasal. Il a été observé que cette minéralisation précoce était due à une augmentation de l'apoptose chez les chondrocytes en absence de MGP mais que l'hypertrophie des chondrocytes n'était pas impactée.

La restauration de l'expression de MGP au niveau des chondrocytes murins corrige la minéralisation pathologique du septum nasal. Ceci démontre encore une fois que la MGP présente une action locale.

Les cristaux calcium-phosphate amorphes sont la principale espèce de minéral retrouvée au niveau du septum nasal. Ainsi, des croisements entre les souris *Mgp*<sup>-/-</sup> et des souris présentant une hypophosphatémie (les souris *Hyp*) ont été réalisés, chez ces souris, il a été observé une correction du phénotype. Cette minéralisation anormale du septum nasal est aujourd'hui considérée comme la principale cause de l'hypoplasie médio-faciale observée chez les souris déficientes en MGP.

Une minéralisation modérée de la synchondrose sphéno-occipitale (SOS) est également observable chez les souris *Mgp*<sup>-/-</sup> mais ne semble pas impliquée dans l'apparition du phénotype crânio-facial du fait de l'absence d'altération de la longueur de la base du crâne (Marulanda et al., 2017).

## C. LE TISSU DENTAIRE

Le dysmorphisme crânio-facial observé chez l'Homme et le rongeur en cas de déficience en MGP s'accompagne également d'une altération du développement de la dentition.

Une étude s'est proposée d'étudier le rôle de MGP dans la minéralisation du tissu dentaire qui prend place au cours du développement.

Pour ce faire, un modèle de surexpression de MGP au niveau des odontoblastes, les souris *Col1a1-Mgp*, a été mis en place par l'équipe du Dr Murshed (Kaipatur et al., 2008).

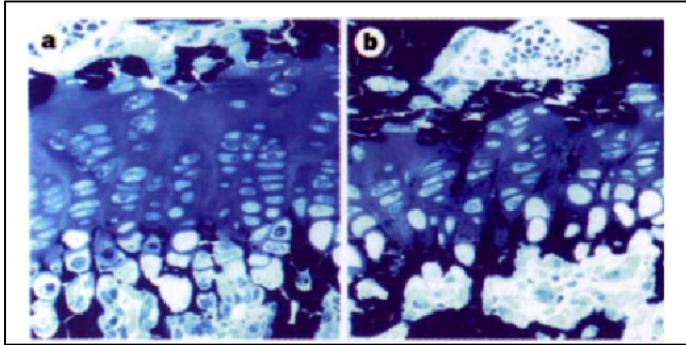
Il a été montré que ces souris *Col1a1-Mgp* présentent une sévère hypo-minéralisation au niveau du tissu dentaire. En effet, chez ces souris, il a été observé une absence presque totale de minéralisation au niveau de la dentine et du ciment cellulaire présent au niveau de la racine dentaire. De plus, la dentine de la couronne dentaire présente des pertes de minéralisation au niveau de certaines zones et le ciment dentaire acellulaire est totalement absent en cas de surexpression de MGP (Kaipatur et al., 2008).

Ainsi MGP semble jouer un rôle majeur dans la régulation de la minéralisation du tissu dentaire.

## D. LE CARTILAGE DE CROISSANCE

Finalement, cette protéine est impliquée dans l'inhibition d'un dernier tissu ostéo-cartilagineux : le cartilage de la plaque de croissance.

Le cartilage de croissance, comme son nom l'indique, est indispensable à la croissance des os longs, il est situé au niveau de l'épiphyse (i.e extrémités) de ce type d'os (cf. partie 3.1.3 de l'introduction). Il a été montré que chez les souris *Mgp*<sup>-/-</sup>, le cartilage de la plaque de croissance va anormalement minéraliser à partir du second mois de vie (Figure 11) (Luo et al., 1997 ; Marulanda et al., 2013). Il est alors possible de penser que cette calcification anormale du cartilage de croissance est responsable du retard de croissance observé chez certains patients Keutel et chez toutes les souris MGP KO.



**FIGURE 11 : MINERALISATION DE LA PLAQUE DE CROISSANCE EN CAS DE DEFICIENCE EN MGP**

*Coloration Von Kossa (mise en évidence des sites de minéralisation à l'aide de sels d'argent) de la plaque de croissance des souris WT (a) et MGP KO (b) âgées de 8 semaines de vie post-natale. A ce stade, les souris MGP KO développent des calcifications pathologiques au niveau du cartilage de croissance, ce qui n'est pas le cas des souris contrôles. Adapté de (Luo et al., 1997).*

Or, il a été observé que les souris déficientes en MGP développaient un retard de croissance et une ostéopénie entre deux et trois semaines de vie, soit bien avant que ne débute la calcification anormale de la plaque de croissance (Luo et al., 1997 ; Laurent et al., 2022).

De plus, le fait que les souris MGP KO présentent une réduction de leur densité minérale osseuse est un véritable paradoxe compte tenu du rôle que tient cette protéine dans l'inhibition de la minéralisation. De récentes études suggèrent un rôle plus complexe de MGP au niveau du tissu osseux notamment dans la régulation de l'activité des ostéoblastes et ostéoclastes (cf. partie 3.6 de l'introduction).

Ces résultats impliquent donc que la protéine matricielle Gla jouerait un rôle dans le développement squelettique post-natal indépendamment de son rôle d'inhibiteur de la calcification des tissus cartilagineux.

## 3. Rôle de MGP dans le développement squelettique

Chez l'Homme, le système squelettique est constitué de 206 os et de trois types de cartilages (cartilage hyalin, fibrocartilage et cartilage élastique). Il s'agit de tissus dynamiques qui subiront de nombreuses modifications lors du développement et en réponse aux différentes contraintes biomécaniques. Le squelette présente trois rôles majeurs au niveau de l'organisme. Premièrement, les os, à la fois légers et résistants aux forces mécaniques, constituent un support pour les muscles et permettent d'assurer le mouvement/la locomotion à l'aide des articulations. Deuxièmement, le squelette est impliqué dans la protection des organes internes tels que le cœur, les poumons (cage thoracique), le cerveau (crâne) ou la moelle osseuse. Enfin, le squelette joue un rôle dans le métabolisme, du fait de la réserve importante en ions calcium et phosphate qu'il constitue (Hadjidakis et al., 2006).

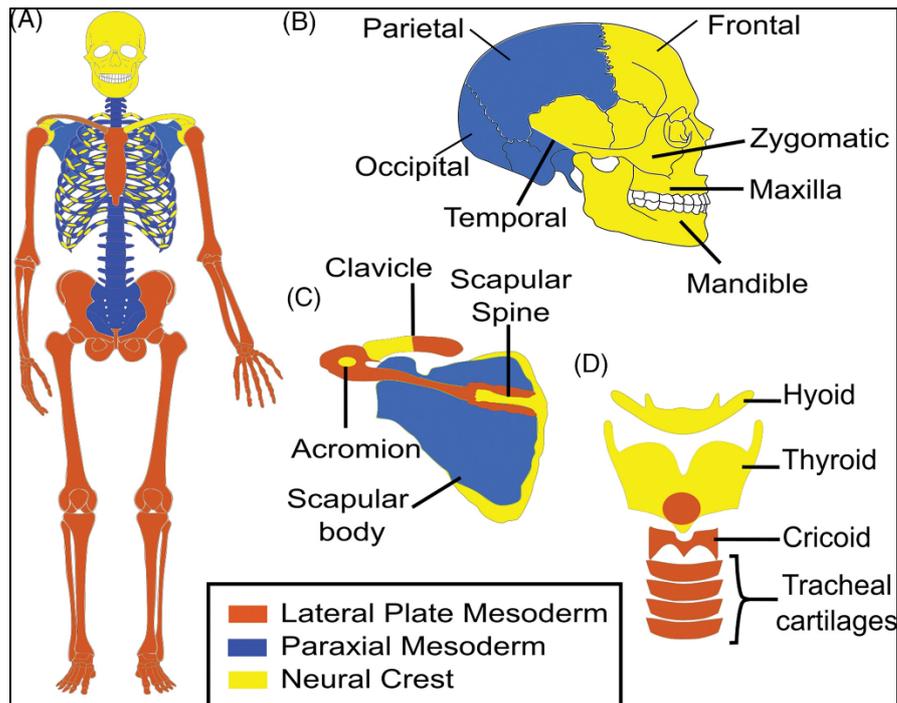
Le développement des éléments squelettiques est un processus complexe et multiphasique qui débute dès les premières étapes du développement embryonnaire.

### 3.1. Le développement squelettique

#### *3.1.1. Origine embryonnaire des éléments squelettiques*

La première étape du développement squelettique consiste en la formation de cellules mésenchymateuses progénitrices ostéochondrales/squelettiques. Ces cellules mésenchymateuses sont formées lors des stades précoces du développement embryonnaire, à partir des feuilletts embryonnaires ectodermique ou mésodermique selon les éléments squelettiques concernés (Figure 12). Les crêtes neurales issues de l'ectoderme sont à l'origine de plusieurs éléments squelettiques crânio-faciaux et du larynx (os hyoïde et thyroïde). Le mésoderme splanchnique et de la plaque latérale est à l'origine des éléments squelettiques crânio-faciaux, du cricoïde, des anneaux trachéaux, du squelette appendiculaire et du

sternum. Ensuite, les somites qui dérivent du mésoderme paraxial aboutiront au développement de sclérotomes, qui sont à l'origine des vertèbres et des côtes (Figure 12). Les vertèbres se développent autour de la notochorde, elles entraîneront le changement de phénotype des cellules de la notochorde, leur migration au niveau des espaces intervertébraux pour aboutir à la formation des noyaux pulpeux (nuclei pulposi) situés au centre des disques intervertébraux (Lefebvre et Bhattaram., 2010 ; Galea et al., 2020).



**FIGURE 12 : ORIGINE EMBRYONNAIRE DES ELEMENTS SQUELETTIQUES**

*Représentation schématique des éléments squelettiques dérivant du mésoderme paraxial (représentés en bleu), du mésoderme de la plaque latérale (représentés en rouge) et des cellules de la crête neurale (représentés en jaune) chez l'Homme. A. Vue frontale de l'ensemble du squelette. B. Vue latérale du crâne. C. Vue latérale de la scapula et de la clavicule. D. Vue frontale des cartilages laryngés et des anneaux trachéaux. Adapté de (Galea et al., 2020).*

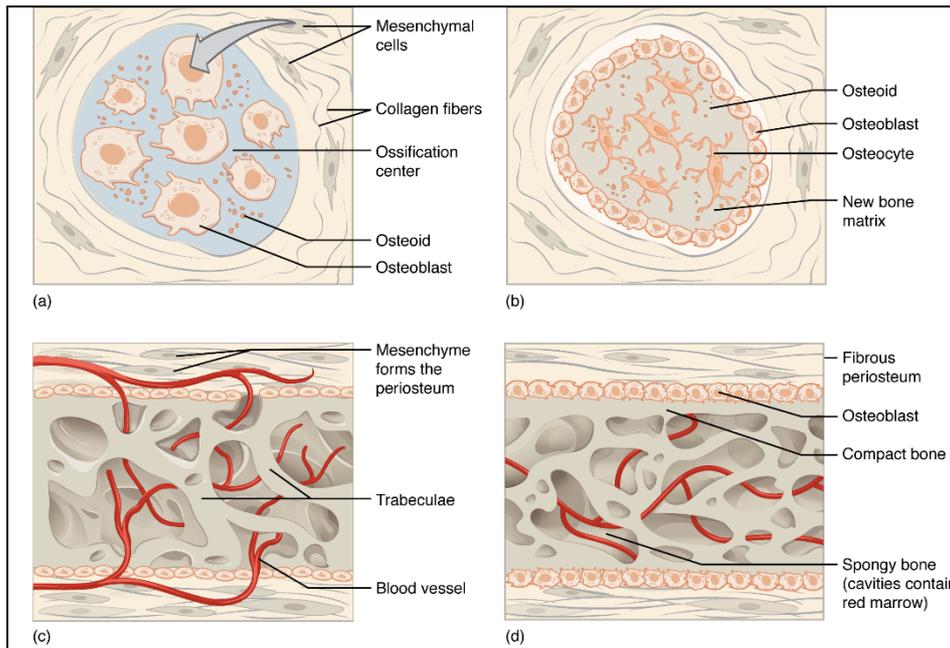
Deux types d'ossifications différentes existent selon le type d'os concerné. Ainsi, la partie latérale de la clavicule, la partie rostrale du neurocrâne (i.e. la boîte crânienne) et le splanchnocrâne (crâne facial) seront formés à la suite d'une ossification de type intramembranaire. Tandis que les éléments du squelette axial (e.g la colonne vertébrale et la cage thoracique), du squelette appendiculaire (fémur, tibia, humérus, radius-ulna), ainsi que

la base du crâne et la partie caudale du neurocrâne seront formés à la suite d'une ossification de type endochondrale (Berendsen et Olsen., 2015).

### *3.1.2. Ossification intramembranaire*

Le processus d'ossification intramembranaire se caractérise par une différenciation directe des cellules mésenchymateuses en cellules de la lignée ostéoblastique.

Ce processus débute par la condensation des cellules mésenchymateuses. La plupart des cellules mésenchymateuses se différencieront progressivement en cellules osseuses immatures (pré-ostéoblastes) qui seront d'abord localisées dans une zone restreinte nommée centre d'ossification. Les ostéoblastes vont ensuite proliférer et produire une matrice pré-osseuse (ostéode) contenant des fibres de collagène de type I et des protéoglycanes. À la suite de dépôts de calcium et de phosphate au sein de la matrice ostéode, cette dernière va minéraliser. Les ostéoblastes ne sont généralement pas présents dans la région de la matrice ostéode qui va calcifier. Il est cependant possible que des ostéoblastes se retrouvent piégés dans la matrice calcifiée, ils deviendront alors des cellules osseuses matures (ostéocytes). A mesure de la sécrétion et de la minéralisation de la matrice ostéode, les centres d'ossifications vont fusionner et finiront par encercler les vaisseaux sanguins à proximité, ceci aboutira à la formation de l'os trabéculaire. Les centres d'ossifications ne fusionnent pas au niveau des jonctions (i.e sutures crâniennes) entre les différents os qui composent le crâne. Ceci permet l'augmentation du volume crânien lors du développement (Opperman et al., 2000). En parallèle, les cellules mésenchymateuses situées en périphérie formeront une membrane appelée périoste. Les cellules mésenchymateuses du périoste se différencieront également en ostéoblastes, produiront une matrice ostéode, ce qui permettra la formation de plusieurs couches de tissu osseux que l'on nomme os cortical. L'os cortical ainsi formé va induire la condensation du tissu osseux et des vaisseaux sanguins, ce qui aboutira à la formation du tissu hématopoïétique (Figure 13) (Gilbert et al., 2000 ; Percival et Richtsmeier., 2013 ; Berendsen et Olsen., 2014 ; Ornitz et Marie., 2015).



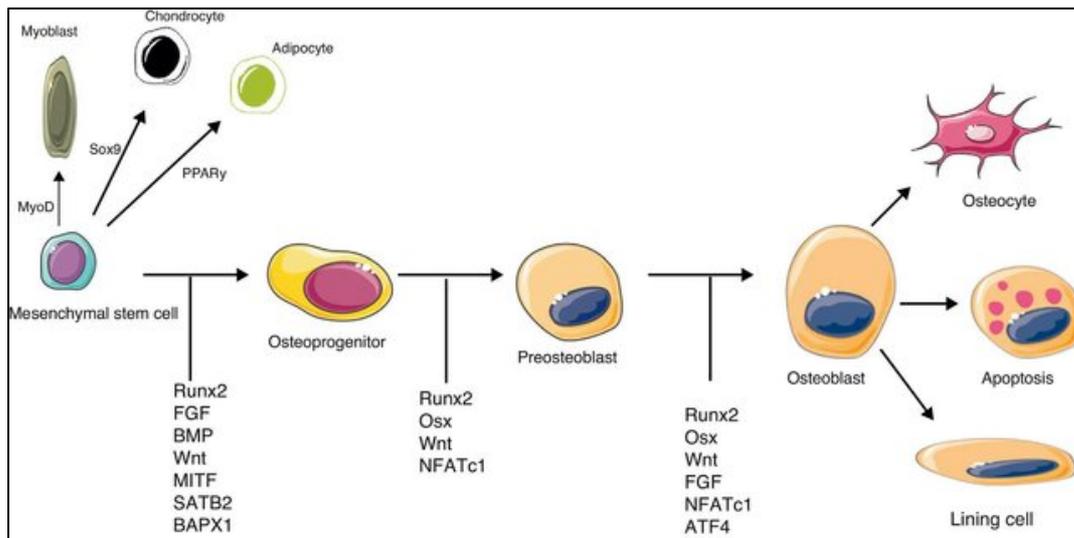
**FIGURE 13 : LES ETAPES DE L'OSSIFICATION ENDOCHONDRALE**

L'ossification intramembranaire peut être divisée en 4 grandes étapes. (a) Condensation des cellules mésenchymateuses qui vont se différencier en cellules de la lignée ostéoblastique, formant ainsi des centres d'ossifications. (b). Sécrétion de la matrice minéralisante ostéode par les ostéoblastes, certaines de ces cellules se retrouveront piégées à l'intérieur et deviendront des ostéocytes. (c). Formation de l'os trabéculaire, du périosteum et invasion vasculaire du tissu osseux. (d). Formation de l'os cortical en surface de l'os trabéculaire qui induira une condensation des vaisseaux sanguins et la mise en place du tissu hématopoïétique. Adapté de l'Oregon State University.

La différenciation des cellules mésenchymateuses en ostéoblastes est essentiellement contrôlée par le facteur de transcription RUNX2/CBFA1. En effet, il a été montré que les souris déficientes en RUNX2 présentaient une absence quasi-totale d'ostéoblastes et ostéoclastes et donc d'ossification. Cette absence d'ossification induit l'apparition de malformations squelettiques sévères (nanisme, raccourcissement des membres, dysmorphisme crânio-facial) ainsi qu'une létalité périnatale précoce des souris RUNX2 KO (Ducy et al., 1997, 1999 ; Komori et al., 1997).

L'expression de RUNX2 activera de manière séquentielle l'expression de plusieurs gènes clés de la différenciation ostéoblastique avec d'abord OSTERIX/Sp7 un autre facteur de transcription, puis le collagène de type I, l'ostéocalcine et enfin l'ostéopontine. Au niveau crânien, les facteurs de transcription MSX2 et DLX5 sont également impliqués dans la

différenciation ostéoblastique en interagissant avec RUNX2 (Dailey et al., 2005 ; Rice et al., 2008). Plus tard, lorsque les ostéoblastes commenceront à être entourés par l'ostéoïde, et à se différencier en ostéocytes, ils exprimeront DMP1 (Dentin Matrix Protein 1). Puis une fois devenus des ostéocytes matures, ces cellules exprimeront la sclérotine. De nombreux facteurs de croissance comme les FGFs, les TGFβs, les BMPs ou les Wnts sont également impliqués dans la différenciation des ostéoblastes (Figure 14).



**FIGURE 14 : ACTEURS MOLECULAIRES DE LA REGULATION DE LA DIFFERENCIATION OSTEOBLASTIQUE.**

*La différenciation des cellules souches mésenchymateuses est conditionnée par des facteurs de régulation clé comme SOX9 (différenciation en chondrocytes), MyoD (différenciation en myoblastes) ou PPARγ (différenciation en adipocytes). La différenciation des cellules mésenchymateuses en ostéoblastes implique différentes étapes toutes régulées par le facteur de transcription clé nommé RUNX2. Adapté de (Arboleya et al., 2013).*

Ainsi, le processus d'ossification intramembranaire se caractérise par une différenciation directe des cellules mésenchymateuses en cellules osseuses ce qui permettra la mise en place rapide d'une matrice minéralisée et résistante.

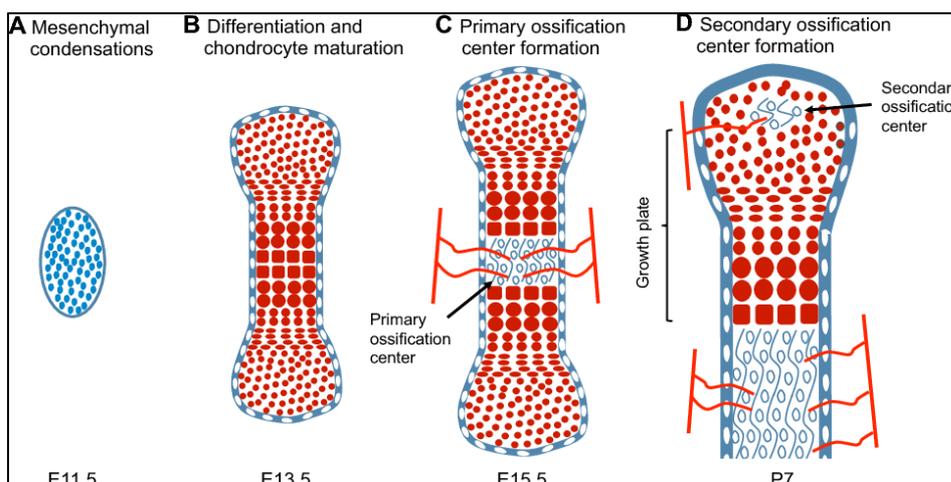
### 3.1.3. Ossification endochondrale

L'ossification de type endochondrale se caractérise par la différenciation des cellules mésenchymateuses en cellules de la lignée chondrogénique, qui s'organiseront en structures cartilagineuses qui serviront de support pour la mise en place du tissu osseux.

Le cartilage hyalin est le type de tissu cartilagineux majoritaire chez l'Homme. Il présente de nombreuses fibres de collagène, notamment du collagène de type II au sein de sa matrice extracellulaire. Chez l'adulte, le cartilage hyalin est présent à la surface des articulations et sert de support pour le larynx, la trachée, le conduit auditif externe, la cloison nasale et le cartilage intercostal. Chez l'embryon, il constitue la majorité du squelette avant d'être remplacé par du tissu osseux lors du processus d'ossification endochondrale.

## A. DESCRIPTION DU PROCESSUS D'OSSIFICATION ENDOCHONDRALE

L'ossification endochondrale, tout comme l'ossification endochondrale, débute par une condensation des cellules mésenchymateuses dérivées des crêtes neurales (cartilages costaux, hyoïdien et thyroïdien) ou du mésoderme (squelette appendiculaire, colonne vertébrale, anneaux trachéo-bronchiques, os crâniens) (Figure 15 A).



**FIGURE 15 : LES ETAPES DE L'OSSIFICATION ENDOCHONDRALE LORS DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE MURIN**

A. Condensation des cellules mésenchymateuses (représentées en bleu) au niveau des bourgeons des membres postérieurs, au stade E11.5 du développement embryonnaire. B. Différenciation des cellules mésenchymateuses en chondrocytes (représentés en rouge) et initiation du processus de maturation, au stade E13.5. C. Formation et invasion vasculaire des centres d'ossifications primaires (cercles non colorés) à partir du stade E15.5. D. Formation des centres d'ossifications secondaires aux alentours de 7 jours de vie post-natale. Adapté de (Kozhemyakina et al., 2015).

Pendant l'étape de condensation mésenchymateuse, les cellules expriment des molécules connues pour jouer un rôle dans l'adhésion cellulaire telles que N-CAM, la N-cadhérine, la té nascine-C ainsi que des composants de la matrice extra-cellulaire comme le collagène de type I (Hall et Miyake., 2000).

Ensuite, les cellules mésenchymateuses situées au cœur de ces condensations commencent à se différencier en chondrocytes. Il s'agit d'une étape cruciale, qui aboutit à la mise en place de chondrocytes de forme arrondie qui commenceront à produire des composants de la matrice extracellulaire tels que les collagènes de type II, IX et XI, des protéoglycanes (dont l'agré cane). A l'inverse, l'expression du collagène de type I est inhibée dans les cellules au centre de ces condensations. Les cellules de la périphérie continueront d'exprimer le collagène de type I et formeront par la suite le péri chondre, tissu conjonctif vascularisé et innervé assurant la nutrition et la démarcation du cartilage vis-à-vis du tissu mésenchymateux.

Les chondrocytes vont ensuite proliférer et s'organiser en colonnes, ce qui définira l'axe longitudinal de la future plaque de croissance. Les chondrocytes près du centre des futurs os (diaphyse) vont alors arrêter de proliférer et initier le processus d'hypertrophie. Les chondrocytes deviendront alors des chondrocytes pré-hypertrophiques caractérisés par l'expression de RUNX2, d'OSX/SP7 et IHH (Indian Hedgehog) qui permettent la différenciation terminale des chondrocytes et la minéralisation de la matrice. Ces chondrocytes vont s'hypertrophier (augmentation du volume de 10-15 fois) du fait d'une absorption massive d'eau (Figure 15B). Les chondrocytes hypertrophiques se caractérisent notamment par l'expression de collagène de type X et la phosphatase alcaline (ALP), dans leur phase terminale ils expriment aussi MMP13 (Matrix Metallopeptidase 13), VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor alpha), des agré canases (ADAMTS) et l'ostéopontine. Les chondrocytes hypertrophiques entrent ensuite en apoptose ou se trans différencient en ostéoblastes (Zuscik et al., 2008 ; Zhou et al., 2014 ; Hata et al., 2017 ; Aghajanian et al., 2018).

MMP13 et les agré canases sont capables de dégrader la matrice extracellulaire, ce qui formera des cavités, l'effet angiogénique de VEGF-A favorisant alors leur invasion par des vaisseaux sanguins. Cette invasion vasculaire permet l'arrivée de cellules endothéliales, de cellules de la moelle osseuse et d'ostéoclastes au niveau du cartilage. Les cellules de la moelle osseuse se différencient en ostéoblastes et produisent du collagène de type I et des protéines telles que l'ostéocalcine ou l'ostéopontine.

La matrice cartilagineuse résiduelle sert alors de charpente pour le dépôt de minéraux, la formation de tissu osseux et son remodelage par les ostéoblastes et ostéoclastes (Mackie et al., 2007 ; Sivaraj et al., 2016).

La formation du tissu osseux prend place au centre des os (diaphyse) au niveau de centres d'ossifications primaires qui progresseront vers les extrémités distales et proximales (épiphyes) des os. La portion restante de cartilage, située au niveau des deux extrémités est appelée cartilage ou plaque de croissance (Figure 15C).

## B. FACTEURS DE TRANSCRIPTION MAJEURS DE L'OSSIFICATION ENDOCHONDRALE

### ➤ *SOX9*

Le facteur de transcription SOX9 est un régulateur clé de l'initiation de la chondrogenèse, il est déjà exprimé par les cellules mésenchymateuses avant leur condensation. Des études menées sur des modèles de souris déficientes en SOX9 ont montrées que l'absence de SOX9 au niveau des cellules de la crête neurale conduit à un développement crânio-facial aberrant. A l'inverse, la surexpression de *Sox9* lors de la condensation des cellules mésenchymateuses murine conduit à des chondrogenèses ectopiques (Hata et al., 2017).

En agissant de concert avec les facteurs SOX5 et 6, SOX9 est responsable de l'expression des composants de la matrice extracellulaire du cartilage tels que le collagène de type II et l'agrécan au niveau des cellules mésenchymateuses chondroprogénitrices (Lefebvre et al. 1998 ; Lefebvre et Smits., 2005 ; Han et Lefebvre 2008).

Au niveau du sclérotome, la molécule Sonic Hedgehog (SHH) produite par la notochorde est responsable de l'induction de l'expression des facteurs de transcription SOX9 et NKX3.2, lui-même impliqué dans le maintien de l'expression de *Sox9* (Zeng et al., 2002). La famille des TGF $\beta$  est également impliquée dans le maintien de l'expression de *Sox9*. En effet la stimulation de Smad3 et p300 par la voie de signalisation au TGF $\beta$  favorise la transcription de gènes de la chondrogenèse médiée par *Sox9* (Guasto et al., 2009). La sous-famille des BMPs est également impliquée dans le maintien de l'expression de *Sox9* et *Nkx3.2* mais seulement si l'induction par SHH a déjà eu lieu (Murtaugh et al., 2001 ; Zeng et al., 2002). En présence de BMP, *Sox9*

est capable de réguler sa propre expression et d'augmenter l'expression de *Nkx3.2*, qui est capable de réprimer l'expression d'inhibiteurs de *Sox9* (Zeng et al., 2002 ; Kim and Lassar, 2003; Kumar and Lassar, 2009; Mead et al., 2013).

SOX9 est aussi impliqué dans la survie des chondrocytes via la voie PI3K/AKT et inhibe l'hypertrophie des chondrocytes au cours de leur maturation (Bi et al., 2001 ; Akiyama et al., 2002 ; Ikegami et al., 2011 ; Dy et al., 2012). SOX9 peut directement réprimer l'expression de gènes des chondrocytes hypertrophiques tels que *Col10a1* ou *Vegfa* (Hattori et al., 2010 ; Leung et al., 2011). *Sox9* est également capable d'interagir directement avec Runx2 et d'antagoniser son activité transcriptionnelle pro-hypertrophique (Zhou et al., 2006).

Enfin, SOX9 est capable de réguler négativement l'activité transcriptionnelle de RUNX2 en favorisant l'expression de *Nkx3.2* (Yamashita et al., 2009). De même, SOX9 est capable de réguler négativement l'expression de la voie des Wnt, notamment en induisant la dégradation de la  $\beta$ -caténine (Akiyama et al., 2004 ; Topol et al., 2009). La voie des Wnts étant capable de favoriser l'hypertrophie des chondrocytes, notamment par l'action de Wnt5a. Il est possible que la régulation de cette voie par SOX9 soit en partie responsable de son effet inhibiteur vis-à-vis de la maturation des chondrocytes (Hartmann and Tabin, 2000 ; Enomoto-Iwamoto et al., 2002; Yang et al., 2002 ; Tamamura et al., 2005; Später et al., 2006).

### ➤ *RUNX2 ET RUNX3*

Les facteurs de transcription RUNX2/CBFA1 et RUNX3/CBFA3 sont des régulateurs clés de l'hypertrophie des chondrocytes. En effet, des modèles de souris déficientes en RUNX2, les souris *Runx2*<sup>-/-</sup>, ou des souris surexprimant une forme mutée de RUNX2 (RUNX2 dominant négatif, DN-Runx2), il a été observé un retard et une diminution significative de l'hypertrophie des chondrocytes. A l'inverse, la surexpression de *Runx2* chez des modèles de souris transgéniques induit une accélération de l'hypertrophie des chondrocytes et une ossification précoce de plusieurs éléments cartilagineux tel le septum nasal, les vertèbres, le larynx ou les anneaux trachéaux (Inada et al., 1999 ; Kim et al., 1999 ; Ueta et al., 2001).

La génération du modèle de souris *Runx3*<sup>-/-</sup>, indique un rôle redondant de RUNX3 dans la régulation de la maturation des chondrocytes. En effet, les souris *Runx3*<sup>-/-</sup> présentent un

retard modéré de la maturation des chondrocytes et de l'invasion vasculaire du cartilage au stade embryonnaire mais ne développent pas d'anomalie lors du développement post-natal.

Cependant, les souris déficientes à la fois en RUNX2 et RUNX3, les souris *Runx2<sup>-/-</sup>* ; *Runx3<sup>-/-</sup>* présentent un phénotype aggravé par rapport aux souris *Runx2<sup>-/-</sup>* avec une absence totale de maturation des chondrocytes (Yoshida et al., 2004).

Plusieurs études ont montré que RUNX2 est capable de réguler directement l'expression de gènes exprimés par les chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques tels que *Ihh*, *Col10a1*, *Mmp13* ou *Vegfa* (Selvamurugan et al., 2000 ; Zelzer et al., 2001 ; Drissi et al., 2003 ; Zheng et al., 2003). RUNX2 est également capable de réguler l'expression d'autres gènes tels que *Runx3*, *ST2* (Suppression of Tumorigenicity 2), *Smorc1* et *Smorc2* qui sont des régulateurs de la maturation des chondrocytes (Rad et al., 2017 ; Takahata., 2021).

RUNX2 est également connu pour réguler le facteur de transcription clé nommé OSTERIX (OSX/SP7).

#### ➤ OSTERIX

Le facteur de transcription OSX est impliqué dans les dernières étapes de l'ossification endochondrale. En effet, chez des souris déficientes en OSX, l'ossification endochondrale est stoppée au stade hypertrophique et il n'y a pas de minéralisation de la matrice cartilagineuse (Nakashima et al., 2002). Chez ces souris, il a également été observé une diminution de l'expression de VEGF. Des expériences *in vitro* ont montré que OSX est capable de se fixer au promoteur de *Vegfa*, confirmant qu'il est capable de réguler son expression (Tang et al., 2012). Des études complémentaires sur des souris déficientes ont mis en évidence le rôle d'OSX dans l'induction de l'expression de *Mmp13* médiée par RUNX2. La seule expression de RUNX2 n'est en effet pas suffisante pour induire l'expression de *Mmp13*. De plus, il a été observé que la restauration de l'expression de MMP13 dans des cultures de chondrocytes déficients en OSX permettait la minéralisation de la matrice (Nishimura et al., 2012).

### ➤ AUTRES FACTEURS DE TRANSCRIPTION

De récentes études indiquent que le facteur de transcription Zfhx4 (zinc finger homeobox 4) semble impliqué dans la régulation de l'expression de MMP13 médiée par Osterix (Nakamura et al., 2021).

De nombreux autres facteurs de transcription tels que MEF2C, FOX2A/3A, FOXC1/C2, HOXA13 ou HOXD13 sont également impliqués dans la régulation du processus d'ossification endochondrale (Fromental-Ramain et al., 1996 ; Kaestner et al., 1998 ; Stadler et al., 2001 ; Viega et al., 2004 ; Arnold et al., 2007 ; Ionescu et al., 2012 ; Almubarak et al., 2021).

En plus de ces facteurs de transcription, un grand nombre de voies de signalisation est impliqué dans le contrôle de l'ossification endochondrale.

## C. LES VOIES DE SIGNALISATION MAJEURES DE L'OSSIFICATION ENDOCHONDRALE

### ➤ LES WNTS

La voie des Wnts via l'intermédiaire de la  $\beta$ -caténine est capable de réguler l'expression de *Sox9*. En effet, la perte d'expression de la  $\beta$ -caténine induit une augmentation de l'expression de *Sox9* au niveau des cellules mésenchymateuses et favorise la formation de cartilage (Day et al., 2005 ; Hill et al., 2005). La voie Wnt semble également capable de réprimer l'expression de *Sox9* par des mécanismes épigénétiques. Il a ainsi par exemple pu être observé que la signalisation aux Wnts induisait la mise en place de méthylation de l'ADN et de marques répressives de la chromatine au niveau du promoteur du gène codant SOX9, bloquant son expression de manière irréversible (Kumar et Lassar., 2014).

### ➤ LES FGFS

Les Fibroblasts growth factors (FGFs) sont des facteurs de croissance capables de réguler l'expression de *Sox9*. Il a été observé que dans des chondrocytes primaires, les FGFs sont capables d'augmenter l'expression de *Sox9* (Murakami et al., 2000). Les FGFs peuvent

contrecarrer les mécanismes épigénétiques médiés par la voie Wnt en bloquant le recrutement de l'ADN méthylase DNMT3A via les kinases ERK1 et 2 (Kumar et Lassar., 2014). Les FGFs sont également impliqués dans la condensation des cellules mésenchymateuses au niveau des bourgeons des membres indépendamment de l'action de SOX9. En effet, il a été observé que des souris n'exprimant pas les récepteurs FGFR1 et FGFR2, les souris *Fgfr1/2Prx1-Cre*, présentaient une réduction des éléments du squelette appendiculaire. Cette même étude a également mis en évidence le rôle de la signalisation aux FGFs dans la survie et la prolifération des cellules mésenchymateuses (Yu et Ornitz., 2008).

Le rôle de la signalisation par FGFR3 dans le développement squelettique est développé dans la partie 3.3 de ce manuscrit.

#### ➤ LES BMPS

Les BMPs (Bone morphogenetic proteins) sont des membres de la superfamille des TGF $\beta$ . La voie des BMPs, plus particulièrement BMP2, a été démontrée comme capable d'induire l'expression de *Runx2*. Chez des souris déficientes en BMP2, il a pu être observé de sévères malformations de l'ensemble des éléments squelettiques associées à une diminution significative de l'expression des gènes *Col2a1*, *Col10a1*, *Mmp13*, *Runx2* et *Osx*. A l'inverse, un autre membre de la famille des BMPs, BMP7, est un inhibiteur de la maturation des chondrocytes. Cette inhibition semble être due en partie à une induction de l'expression de *Nkx 3.2* répresseur de *Runx2* (Caron et al., 2013).

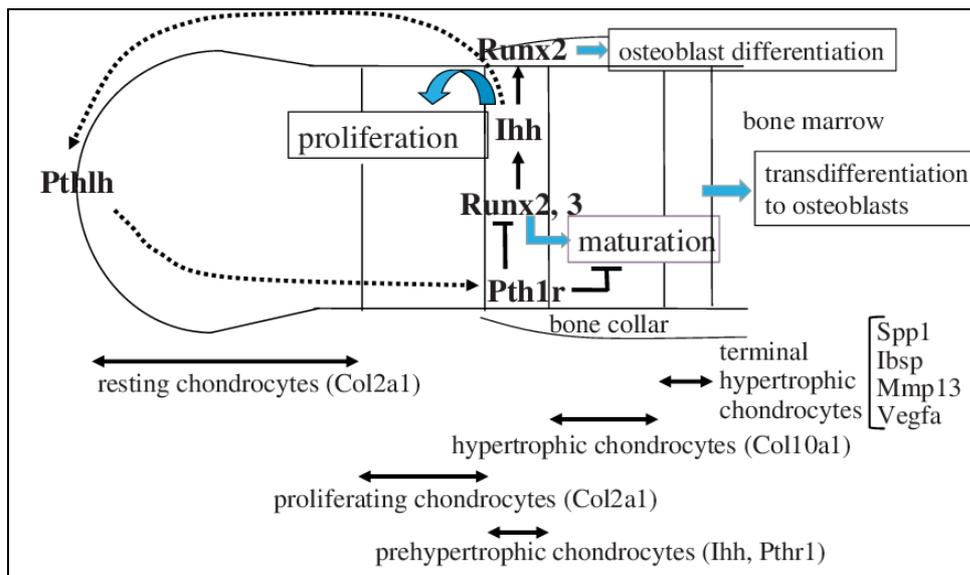
#### ➤ LA BOUCLE IHH/PTHrP

IHH (Indian Hedgehog) et PTHrP (Parathyroid related peptide) sont également des régulateurs majeurs de la différenciation des chondrocytes.

PTHrP (Parathyroid hormone-related peptide) est fortement exprimée au niveau des cellules quiescentes périarticulaires mais aussi, plus faiblement, par les chondrocytes prolifératifs précoces (Lee et al., 1996 ; St-Jacques et al., 1999). Le récepteur de PTHrP, nommé PTH1R est un récepteur couplé aux protéines G principalement exprimé au niveau des chondrocytes pré-

hypertrophiques, mais est aussi faiblement exprimé par les chondrocytes prolifératifs. (Vortkamp et al., 1996 ; St-Jacques et al., 1999). La délétion de *Pthrp* ou du gène codant son récepteur dans des modèles murins induit une diminution de la prolifération des chondrocytes ainsi qu'une maturation des chondrocytes et une ossification précoce (Karaplis et al., 1994 ; Lanske et al., 1996 ; Lee et al., 1996). Il a été montré que la liaison de PTHrP à son récepteur va induire l'activation de la protéine Kinase A (PKA) ce qui va favoriser l'expression de *Sox9* mais aussi induire la translocation de HDAC4 (Histone deacetylase 4) vers le noyau et ainsi inhiber le facteur de transcription pro-hypertrophique MEF2 (Huang et al. 2001 ; Guo et al. 2002 ; Kozhemyakina et al., 2009). D'autres études ont montré que PTHrP est capable d'inhiber l'hypertrophie des chondrocytes par le biais de NKX3.2, répresseur de *Runx2* (Provot et al., 2006).

IHH est une protéine de la famille Hedgehog qui contrôle la synthèse de PTHrP et est exprimée au niveau des chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques précoces (Vortkamp et al., 1996). En effet, les modèles murins déficients en IHH n'expriment pas PTHrP et présentent un phénotype similaire aux souris déficientes en PTHrP, à savoir une diminution de la prolifération des chondrocytes et une hypertrophie précoce des chondrocytes (St-Jacques et al., 1999). De plus, il a été observé chez des souris *Ihh*<sup>-/-</sup> que l'expression constitutivement active de *Pth1r* corrige l'hypertrophie anormalement précoce des chondrocytes, mais pas la réduction de la prolifération. Ceci suggère que IHH régulerait la prolifération des chondrocytes indépendamment de son rôle d'inhibiteur de l'hypertrophie médiée par PTHrP (Karp et al., 2000). En effet, d'autres études ont montré qu'IHH induit la prolifération des chondrocytes par la stimulation de l'expression de la cycline D1, protéine impliquée dans la régulation du cycle cellulaire (Long et al., 2001). De plus, IHH est capable d'inhiber l'activité de la forme répressive de GLI3 ce qui va favoriser la transition des chondrocytes arrondis quiescents vers la prolifération (Kobayashi et al., 2005 ; Koziel et al., 2005) L'inhibition de GLI3 est également le mécanisme par lequel IHH régule l'expression de *PTHrP* (Hilton et al., 2005 ; Koziel et al., 2005). A l'inverse, PTHrP va diminuer l'expression de *Ihh* en inhibant la maturation des chondrocytes médiée par RUNX2 (Iwamoto et al., 2003). Ceci crée alors une boucle de rétrocontrôle qui permet d'éviter que tous les chondrocytes immatures initient le processus d'hypertrophie en même temps, ce qui entraînerait la perte totale de ce pool de cellules chondroprogénitrices (Figure 16).

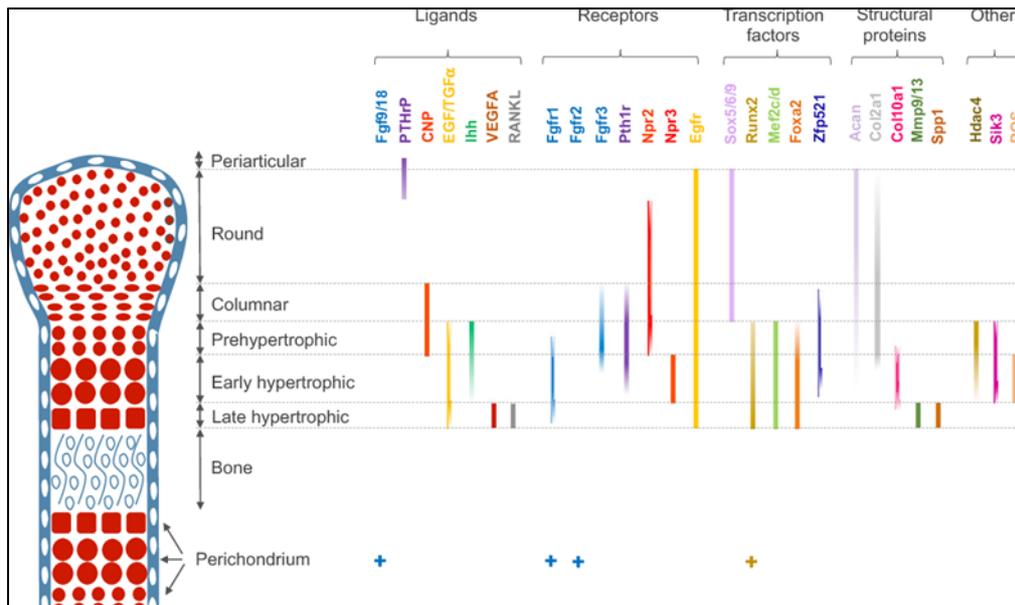


**FIGURE 16 : BOUCLE DE RETRO-CONTROLE IHH-PTHRP**

Au niveau des chondrocytes pré-hypertrophiques, le facteur de transcription RUNX2 induit l'expression du gène codant IHH (Indian Hedgehog). IHH induit la prolifération des chondrocytes et l'expression de PthrP (Parathyroid hormone related peptide, aussi appelée parathyroid hormone like hormone (Pthlh)). PTHrP est capable d'inhiber l'expression de Runx2 et donc d'Ihh, ainsi que la maturation des chondrocytes, par l'intermédiaire de son récepteur nommé PTH1R (Parathyroid hormone 1 receptor). Cet enchaînement d'événements moléculaires crée alors une boucle de rétro-contrôle négatif.

En conclusion, la différenciation des chondrocytes lors de l'ossification endochondrale implique de nombreux acteurs moléculaires qui sont finement régulés de manière spatio-temporelle (Figure 17).

La croissance des os longs se poursuit aux extrémités épiphysaires lors du développement post-natal. Cette croissance est marquée par la mise en place de centres d'ossifications secondaires au niveau de la zone contenant les chondrocytes arrondies quiescents.



**FIGURE 17 : SCHEMA RECAPITULATIF DES GENES IMPLIQUES DANS L'OSSIFICATION ENDOCHONDRALE**

*Représentation schématique de la zone d'expression des principaux acteurs moléculaires de l'ossification endochondrale au niveau plaque de croissance des os longs murins, au stade E15.5 du développement embryonnaire. Adapté de (Kozhemyakina et al., 2015).*

#### **D. LA FORMATION DES CENTRES D'OSSIFICATION SECONDAIRES**

Les centres d'ossification secondaires (SOC) sont des structures qui ont été développées par les amniotes afin de répondre aux contraintes de la vie terrestre. Il est proposé que les SOC jouent un rôle dans la protection des chondrocytes hypertrophiques de la plaque de croissance face aux forces mécaniques auxquelles ces cellules sont soumises (Xie et al., 2020).

Ces centres d'ossifications secondaires se développent rapidement après la naissance chez l'Homme et chez les rongeurs au niveau des épiphyses et permettent de séparer le cartilage de croissance et le cartilage articulaire (Hall., 2015). La délimitation spatiale des cartilages de croissance et articulaires ne semble pas indispensable à la croissance des os et la fonction articulaire. En effet, cette délimitation est absente chez plusieurs espèces telles que les Urodèles, les Crocodiliens, les Chéloniens et les Proto-tétrapodes (Fröbisch et Shubin., 2011; Sanchez et al., 2014; Sanchez et al., 2016).

Plusieurs études proposent que les centres d'ossifications secondaires se mettent en place en réponse aux contraintes mécaniques. Il a ainsi été observé que l'application de contraintes

mécaniques au niveau d'explants de cartilage issus de condyles fémoraux de jeunes lapins accéléreraient la formation du SOC et augmenterait l'expression de *Col10a1* et de *Runx2* (Sundaramurthy et al., 2006). A l'inverse, des explants issus de métatarses de rats âgés de 8 jours ne développent pas de SOC en absence d'application de forces mécaniques même après plus de deux mois de culture (Chagin et al., 2010).

Cependant cette hypothèse est contredite par le fait que plusieurs espèces, telles les Chiroptères ou les Marsupiaux, développent des centres d'ossifications secondaires avant d'être soumis à des contraintes mécaniques. Il semblerait alors que la mise en place de ces structures osseuses soient soit également sous contrôle de facteurs génétiques (Xie et al., 2020).

Durant le développement embryonnaire et les premiers jours du développement post-natal, les chondrocytes épiphysaires expriment fortement SHH, qui par l'intermédiaire de GLI1, va favoriser l'expression de *Sox9/Sox5/Sox6* et permettra donc de maintenir les chondrocytes en prolifération en inhibant leur transition vers l'hypertrophie (Tavella et al., 2004 ; Aghajanian et al., 2017).

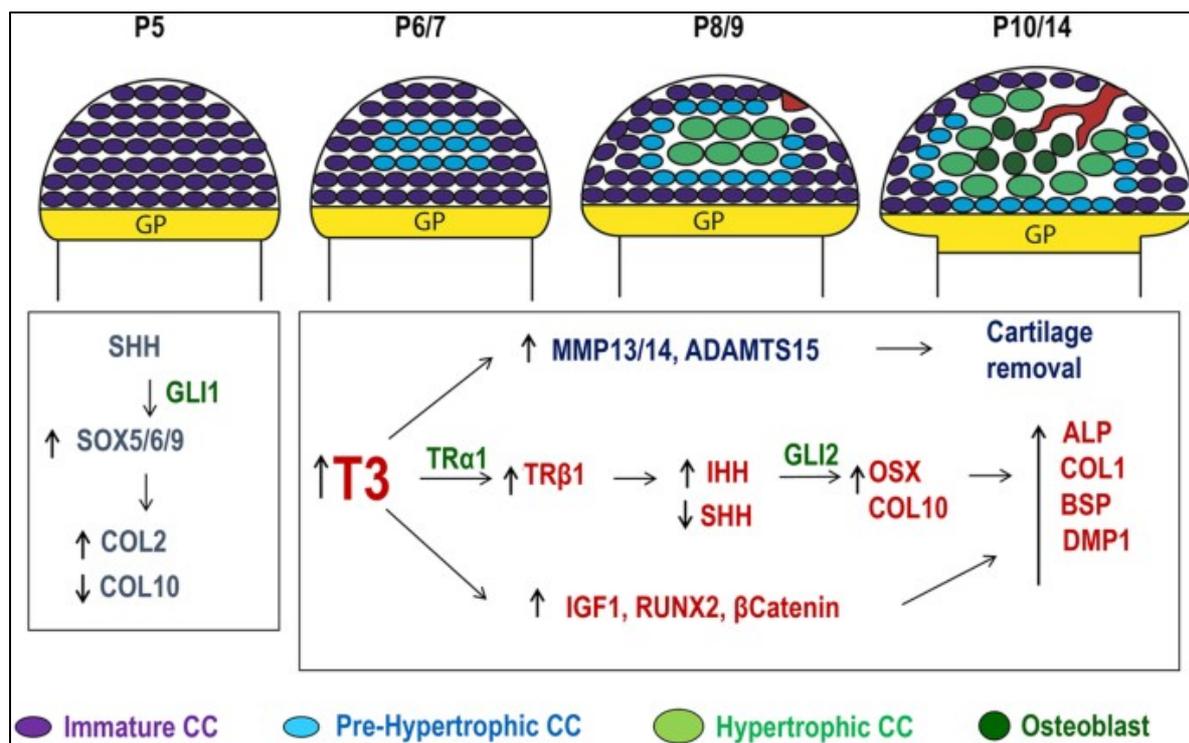
La mise en place des centres d'ossification secondaires semble être dépendante de l'hormone thyroïdienne T3 (Triiodothyronine). En effet, il a été observé que la mise en place du SOC est concomitante de l'élévation des taux sanguins chez de nombreuses espèces, dont l'Homme. De même, les souris ayant une hypothyroïdie présentent un sévère retard dans le développement du SOC et de la plaque de croissance. L'hormone thyroïdienne est capable d'induire l'expression d'*Ihh* par l'intermédiaire de son récepteur nommé THR $\beta$ 1 (Thyroid Hormone Receptor  $\beta$ 1) (Basset et al., 2008 ; Xing et al., 2012 ; Xing et al., 2014 ; Xing et al., 2016).

La forte augmentation de l'expression d'IHH va contrebalancer l'effet inhibiteur de SHH et favoriser la maturation des chondrocytes épiphysaires. En effet, par l'intermédiaire de GLI2, IHH va diminuer l'expression de *Sox9* et de *Col2a1* et favoriser l'expression de gène de l'hypertrophie tels que *Col10a1*, *Osx* et *Mmp13* (Xi et al., 2012 ; Xi et al., 2013 ; Aghajanian et al., 2017).

L'hormone thyroïdienne favorise également l'expression de gènes impliqués dans l'hypertrophie des chondrocytes tels que *Runx2*, *IGF-1*, la *β-caténine* et les agrécanases *ADAMTS* indépendamment de la voie IHH (Xing et al., 2012 ; Wang et al., 2010).

Il est proposé que le début du processus d'ossification passerait par deux mécanismes qui se dérouleraient simultanément au sein de l'épiphyse. Premièrement, de manière similaire à la mise en place des centres d'ossification primaires, il y a une dégradation de la matrice cartilagineuse riche en collagène de type II par MMP13, les agrécanes qui sont remplacées par du collagène de type X sécrété par les chondrocytes hypertrophiques. La minéralisation de la matrice riche en collagène X sera inhibée grâce à l'activation d'inhibiteurs de la minéralisation tels que DMP1, ce qui favorisera sa dégradation par MMP9 (Gomez et al., 2022). Chez la souris, la dégradation de la matrice extracellulaire aboutit à la formation de canaux cartilagineux, qui permettront l'invasion de l'épiphyse par des vaisseaux sanguins et le début du processus d'ossification secondaire. Il a été montré que l'invasion vasculaire débute dès le premier jour de vie postnatale avec l'accumulation de vaisseaux sanguins immunopositifs pour l'endomucine au niveau périarticulaire. Au stade P1, des cellules ostéoblastiques (TLAP positives) et des ostéoclastes (TRAP positives) sont colocalisés avec les vaisseaux sanguins au niveau de la région périarticulaire. Il a été montré que les vaisseaux sanguins et les ostéoclastes sont également capables de participer à la dégradation du cartilage en exprimant MMP9 (Hashimoto et al., 2019). Lors de l'invasion de l'épiphyse, ces vaisseaux se structurent de sorte à former un glomérule. D'autres études indiquent que des cellules mésenchymateuses périarticulaires sont impliquées dans la vasculogénèse et l'angiogénèse. En effet, il a été observé que ces cellules périarticulaires sont capables de migrer vers le centre de l'épiphyse lors de la formation des canaux cartilagineux et qu'elles expriment VEGF de manière concomitante, ce qui n'est pas le cas des autres chondrocytes avoisinants (Tong et al., 2019).

En parallèle de la dégradation de la matrice et de l'invasion vasculaire, l'expression d'OSX au niveau des chondrocytes hypertrophiques favorise l'expression de gènes ostéoblastiques. Il est ainsi proposé qu'au moins une partie du processus d'ossification est médiée par la transdifférenciation des chondrocytes hypertrophiques en ostéoblastes (Figure 18) (Aghajanian et al., 2017).



**FIGURE 18 : FORMATION DES CENTRES D’OSSIFICATION SECONDAIRES LORS DU DEVELOPPEMENT POSTNATAL MURIN**

La formation des centres d’ossifications secondaires (SOC) débute entre 6 et 7 jours de vie post-natale chez la souris. A ce stade, les niveaux d’hormone thyroïdienne augmentent fortement ce qui va stimuler l’expression de *Ihh* par l’intermédiaire du récepteur *THRβ1* (Thyroid Hormone Receptor  $\beta 1$ ). *IHH* va alors favoriser la maturation des chondrocytes (CC) présents au niveau de la zone quiescente de la plaque de croissance en diminuant les niveaux d’expression des gènes codant pour le collagène de type II et le facteur de transcription *SOX9* tout en augmentant l’expression des gènes codant pour *MMP13* et *ADAMTS5*. Ces enzymes permettront alors la dégradation de la matrice extracellulaire cartilagineuse riche en collagène de type II. Au stade P8/P9, les chondrocytes commenceront à exprimer le collagène de type X et le facteur de transcription *OSX*, ce qui entrainera l’expression de *DMP1* (Dentin matrix protein 1) et *ALP* (Alkaline phosphatase) et la minéralisation de la matrice cartilagineuse. En parallèle, l’invasion vasculaire du SOC commencera au niveau des chondrocytes articulaires périphériques. Entre les stades P10 et P14, l’invasion vasculaire, la minéralisation de la matrice et l’apoptose des chondrocytes permettront le remplacement progressif du cartilage de croissance par du tissu osseux. Adapté de (Aghajanian et al., 2017).

A la suite de la mise en place du SOC, la croissance des os longs au niveau de la plaque de croissance sera maintenue.

Des études récentes ont montré qu’à la suite de la mise en place du SOC, une niche de cellules souche située à sa bordure était présente et permettait de renouveler le pool de

chondroprogéniteurs. Il a été observé que MTORC1 (Mamalian target of rapamycin complex 1) est impliqué dans la régulation de la balance division symétrique/asymétrique de ces cellules souches (Newton et al., 2019).

Chez certaines espèces, le POC et le SOC finiront par fusionner entraînant alors la disparition du cartilage de la plaque de croissance, c'est notamment le cas chez l'Homme. A l'inverse, chez d'autres espèces comme chez le rat ou la souris, il n'y aura pas de fusion des centres d'ossifications et une fine couche de cartilage de croissance sera alors maintenue au niveau de l'épiphyse.

En conclusion la régulation de l'ossification endochondrale, que cela soit au niveau embryonnaire ou post-natal, est un processus multiphasique et complexe. De nombreux acteurs moléculaires sont impliqués dans le développement et le maintien de la plaque de croissance. La moindre dérégulation aura de sévères conséquences sur le développement squelettique, comme l'apparition de malformations ou de retard de croissance.

## 3.2. Dysplasies squelettiques

Le terme « dysplasies squelettiques » est utilisé pour décrire les pathologies osseuses et cartilagineuses qui conduisent à l'apparition de malformations squelettiques, un exemple retrouvé communément chez l'Homme est le nanisme. Actuellement plus de 400 dysplasies ont été décrites dans la littérature, elles peuvent aussi bien être bénignes que létales. Leur prévalence est estimée à 1/5000 naissances (Geister et Camper., 2005). Le syndrome de Keutel décrit dans la partie 2.2 de ce manuscrit fait partie de ces 400 dysplasies squelettiques.

### *3.2.1. Exemples de dysplasies squelettiques associées au retard de croissance*

#### A. L'ACHONDROPLASIE

L'achondroplasie (ACH, OMIM 100800) est la dysplasie squelettique non létale ainsi que la forme de nanisme la plus commune chez l'Homme. Cette pathologie a été décrite pour la

première fois en 1878 par Jules Parrot. Il s'agit d'une maladie autosomale dominante avec 100% de pénétrance. La prévalence de la pathologie est estimée entre 1/15 000 et 1/25 000 naissances. ACH se caractérise par un raccourcissement des os longs des membres de type rhizomélique, c'est-à-dire un raccourcissement disproportionné des éléments squelettiques proximaux (*i.e* humérus et fémur), une macrocéphalie, une hypoplasie médio-faciale, une hyperlordose lombaire (courbure du dos exacerbée), des sténoses spinale ou foraminale, une courbure du tibia, un front proéminent, des otites moyennes avec épanchement fréquentes qui peuvent s'accompagner d'une perte d'audition (Figure 19) (Horton et al., 2007 ; Baujat et al., 2008 ; Ornitz et Legeai-Mallet., 2017).



**FIGURE 19 : SIGNES CLINIQUES DE L'ACHONDROPLASIE A DIFFERENTS AGES**

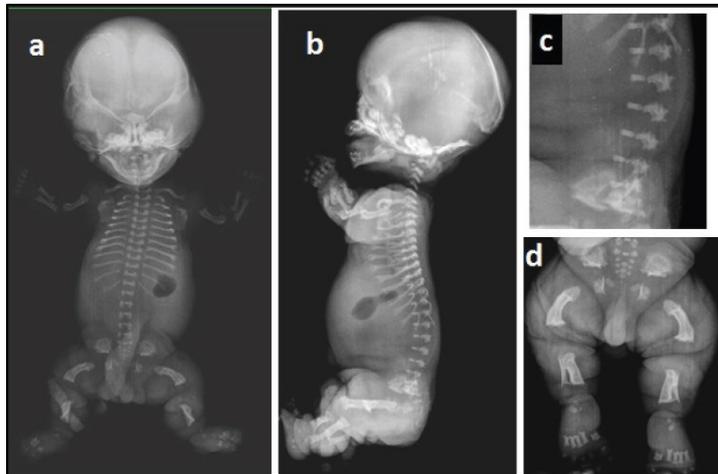
*A. Nouveau-né présentant une macrocéphalie, un front proéminent, une hypoplasie médio-faciale et un raccourcissement des membres de type rhizomélique. B. Image radiographique d'un enfant atteint d'achondroplasie. C. Patient achondroplasique âgé de trois ans présentant les mêmes signes cliniques que ceux décrits précédemment. Adapté de (Horton et al., 2007).*

L'achondroplasie a été associée à des mutations hétérozygotes gain-de-fonction au niveau du gène codant pour FGFR3. La mutation la plus récurrente (95% des cas cliniques) correspond à la substitution d'une glycine par une arginine en position 380 (Gly380Arg) localisée au niveau du domaine transmembranaire (TM) (Rousseau et al., 1994 ; Shiang et al., 1994).

## B. LA DYSPLASIE THANATOPHORE

La dysplasie thanatophore est une maladie autosomale dominante létale mais la plupart des cas sont liés à l'apparition de mutations *de novo* (French et Savarirayan., 2020). La prévalence de la maladie est estimée entre 1/20000 et 1/50000 naissances (Donnelly et al., 2010 ; Barbosa-Buck et al., 2012 ; Sawai et al., 2019).

Il existe deux formes de dysplasie thanatophore, nommée TD de type I (OMIM 187600) et II (OMIM 187601). Les patients atteints de TD de type I présentent une micromélie (petitesse anormale des membres), des courbures fémorales et plus rarement des craniosynostoses et des pertes d'audition (Figure 20).



**FIGURE 20 : SIGNES CLINIQUES DE LA TD DE TYPE I**

*A. Radiographie antéropostérieure d'un fœtus atteint de TD de type I. L'individu présente une macrocéphalie, une cage thoracique plus étroite ainsi qu'un raccourcissement prononcé des membres. B. Radiographie latérale indiquant un désordre de la croissance des vertèbres qui sont longues et plates (i.e platyspondylie) et un raccourcissement des côtes. C. Vue des vertèbres lombaires qui indique une augmentation de l'espace intervertébral. D. Raccourcissement marqué des os iliaques et courbure des fémurs. Adapté de (Chavadi et al., 2015).*

Ces patients peuvent présenter plusieurs types de mutations gain-de-fonction au niveau du gène codant FGFR3. Les deux mutations les plus communes chez les patients atteints de TD de type I (90% des cas cliniques) sont les mutations Arg248Cys et Tyr373Cys (Xue et al., 2014). Des mutations induisant l'élimination du codon stop telles que Ter807Arg, Ter807Ser ou

Ter807Cys (10% des cas cliniques) conduisent à l'extension du domaine intracellulaire de FGFR3. Enfin une mutation conduisant à l'insertion d'un codon, la mutation Arg248LeuCys a été identifiée chez un unique patient (Lindy et al., 2016). Les patients atteints de TD de type II présentent également une micromélie mais leurs fémurs ne sont pas courbés. Ils développent également des craniosynostoses modérées à sévères associées à un syndrome de crâne en trèfle (French et Savarirayan., 2020). Ces patients présentent tous la même mutation gain de fonction au niveau du gène *FGFR3*, il s'agit de la mutation Lys650Glu (Bellus et al., 2000).

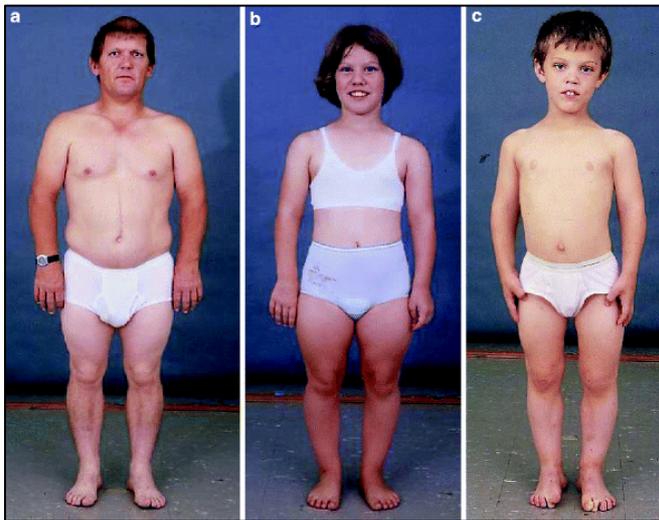
### C. LE SYNDROME D'ACHONDROPLASIE SEVERE-RETARD DE DEVELOPPEMENT-ACANTHOSIS NIGRICANS

Le syndrome d'achondroplasie sévère-retard de développement- *Acanthosis nigricans* (SADDAN, OMIM 616482) est une autre maladie autosomale dominante induisant des malformations squelettiques sévères. La prévalence estimée de la maladie est inférieure à une naissance sur 1 000 000. Les principaux signes cliniques, comme son nom l'indique, sont la mise en place d'un retard de croissance sévère, proche de celui observé chez les patients TD, la mise en place d'acanthosis nigricans (épaississement et hyperpigmentation de la peau, généralement au niveau de la nuque et des aisselles) et des troubles neurologiques. SADDAN est causé par une mutation gain-de-fonction au niveau du gène codant *FGFR3*, la mutation Lys650Met. (Tavormina et al., 1999 ; Bellus et al., 2000). Plus récemment il a été montré que la présence de la mutation perte-de-fonction Thr651Pro en plus de Lys650Met permet de réduire la sévérité des altérations squelettiques en diminuant l'activité de *FGFR3* (Manickam et al., 2013).

### D. HYPOCHONDROPLASIE

L'hypochondroplasie (HCH, OMIM 146000) est une pathologie ayant une prévalence de 1/30 000 naissances et dont les patients présentent des atteintes squelettiques proches de celles de l'achondroplasie bien que plus modérées. Ainsi les patients atteints d'hypochondroplasie présentent un retard de croissance modéré, des bras et des jambes disproportionnellement

courts, des mains et des pieds larges et courts, une sténose spinale et une macrocéphalie (Figure 21) (Bober et al., 1993).



**FIGURE 21 : SIGNES CLINIQUES DE L'HYPOCHONDROPLASIE**

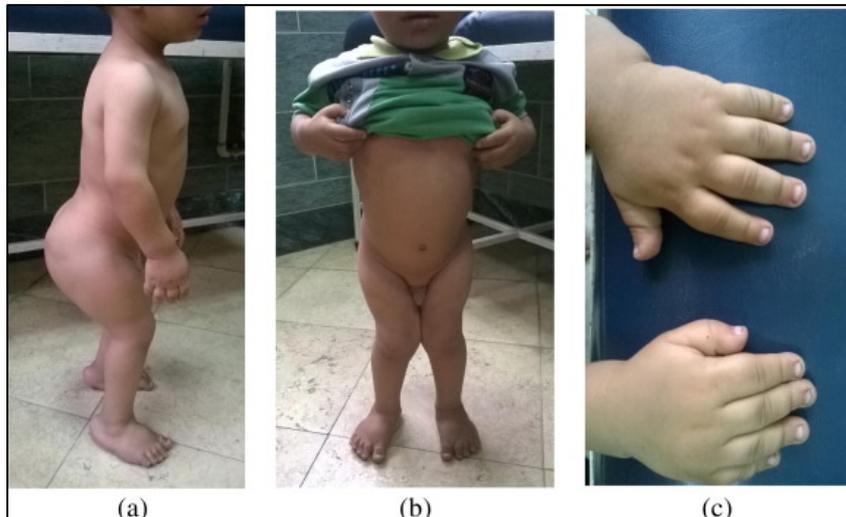
*A-C. Patients atteints d'hypochondroplasia présentant un raccourcissement des membres de type rhizomélisque dont la sévérité est modérée. Adapté de (Chen., 2012).*

Des études ont montré qu'environ 75% des patients atteints d'hypochondroplasia présentent une mutation hétérozygote gain-de-fonction au niveau du gène codant *FGFR3*. La plus commune de ces mutations (60-65% des cas cliniques) est une mutation qui substitue l'asparagine en position 540 par une lysine (Asn540Lys) au niveau du domaine tyrosine kinase 1 (TK1). Les autres patients HCH ne présentent pas de mutations de *FGFR3*, ce qui suggère que des mutations au niveau d'autres gènes pourraient être responsables de l'apparition de cette dysplasie squelettique (Prinos et al., 1995 ; Bonaventure et al., 1996 ; Heuertz et al., 2006).

## E. PSEUDOACHONDROPLASIE

La pseudoachondroplasia (PSACH, OMIM 177170) est une maladie génétique autosomale dominante dont la prévalence estimée est de l'ordre de 1/20 000 naissances (Tufan et al., 2007 ; Briggs et Wright., 2018). Les patients atteints de PSACH ne présentent pas de malformations squelettiques à la naissance, mais à partir de 2 ans, ils développeront une forme modérée de retard de croissance, une déformation des membres inférieurs, une

brachydactylie (raccourcissement/absence des phalanges, os métacarpiens ou os métatarsiens), une atteinte articulaire et une laxité ligamentaire (Figure 22) (Briggs et Chapman., 2002).



**FIGURE 22 : SIGNES CLINIQUES DE LA PSEUDOACHONDROPLASIE**

*A. Patient atteint de pseudoachondroplasie et âgés de 4 ans présentant des déformations au niveau des hanches, une hyperlordose lombaire (courbure prononcée des vertèbres lombaires) et un raccourcissement des membres de type rhizomélique. B. Le patient présente également un genu valgum (désaxation du genou qui entraîne une déviation de la jambe vers l'extérieur). C. Le patient est aussi atteint de brachydactylie (raccourcissement d'un ou plusieurs doigts/orteils). Adapté de (Gamal et al., 2017).*

La PSACH est due à des mutations hétérozygotes perte-de-fonction au niveau du gène codant pour la protéine de la matrice oligomère du cartilage (COMP). Plus de 85% des mutations prennent place au niveau de l'un des 8 domaines thrombospondine type 3-like (TSP3D T1 à T8) de la protéine (Hecht et al., 1995 ; Ichihashi et al., 2018).

## F. AUTRE DYSPLASIES SQUELETTIQUES ASSOCIEE AU RETARD DE CROISSANCE

De nombreuses dysplasies squelettiques sont associées à des mutations au niveau de gènes impliqués dans le processus d'ossification endochondrale.

Tout d'abord des mutations ont été associées aux facteurs de transcription majeurs de l'ossification endochondrale.

En effet, des duplications du gène RUNX2 qui induisent un gain de fonction sont associées à la mise en place du syndrome de dysplasie métaphysaire-dysmorphie-brachydactylie (OMIM 156510). Comme son nom l'indique, cette pathologie autosomique dominante se caractérise par la présence de dysplasie métaphysaire, un retard de croissance, une hypoplasie maxillaire et une brachydactylie (Moffatt et al., 2013).

D'autres études ont associé des mutations hétérozygotes perte-de-fonction du gène codant SOX9 à des dysplasies campoméliques (OMIM 114290). Il s'agit d'une maladie autosomale dominante caractérisée par le raccourcissement et la courbure des membres inférieures, des fossettes cutanées pré-tibiales, un rétrécissement des ailes iliaques, des pédicules thoraciques non minéralisés et une insuffisance respiratoire provoquée par une hypoplasie trachéobronchique (Matsushita et al., 2013).

Des dysplasies squelettiques sont également associées à des mutations au niveau de gènes impliqués dans les voies de signalisation qui régulent l'ossification endochondrale.

C'est notamment le cas des mutations gain-de-fonction au niveau du gène codant SMAD4, qui est impliqué dans la signalisation aux TGFβs et aux BMPs, qui ont été associées à une maladie autosomale dominante nommée syndrome de Myhre. Les patients atteints de ce syndrome développent un retard de croissance, une hypoplasie médio-faciale, une perte d'audition et un retard cognitif (Le Goff et al., 2011).

La voie de signalisation Hedgehog est également associée à des dysplasies squelettiques. Il a en effet été montré que des mutations du gène codant IHH sont associées à la mise en place de brachydactylie de type A1 (OMIM 112500). Cette pathologie autosomale dominante provoque un raccourcissement des phalanges médianes (Kirkpatrick et al., 2003).

De plus, des mutations homozygotes pertes-de-fonction du gène codant pour le récepteur PTHR1 ont été associées à deux pathologies, le syndrome d'Eiken (OMIM 600002) et de Blomstrand (OMIM 215045). Le syndrome d'Eiken est une maladie autosomale récessive rare caractérisée par des dysplasies épiphysaires, des retards d'ossification, un remodelage anormal du tissu osseux et une brachydactylie de type A1 (Jacob et al., 2019). Les patients atteints du syndrome de Blomstrand, autre maladie autosomale récessive rare, présentent un retard de croissance, un raccourcissement des membres, des anomalies du développement

crânio-facial, une densité minérale osseuse augmentée et une ossification endochondrale accélérée (Loshkaijan et al., 1997).

Des mutations au niveau de gènes impliqués dans des processus cellulaires connus pour réguler la plaque de croissance tels que le cil primaire ou l'autophagie sont également à l'origine de dysplasies squelettiques.

En effet, le cil primaire, organelle de petite taille et située à la surface des cellules est impliqué dans la transduction de signal de plusieurs voies de signalisation dont la voie Hedgehog au niveau de la plaque de croissance (cf. partie 3.5 de l'introduction). Des mutations au niveau des gènes impliqués dans la formation et la régulation du cil primaire ont également été associées à des dysplasies squelettiques. Le syndrome de Jeune, aussi appelé dysplasie thoracique asphyxiante (JATD) (OMIM 208500, OMIM 611263, OMIM 613091, OMIM 613819, OMIM 61437) est une maladie autosomique récessive qui est due à des mutations de plusieurs gènes du cil primaire tels que *DYNCH2H1*, *IFT80*, *IFT139* ou *IFT144*. Les patients atteints de JATD présentent un raccourcissement des membres de type rhizomélisque, un raccourcissement des côtes associé à un rétrécissement du thorax, de la brachydactylie, et de la polydactylie (Schmidts et al., 2013).

Ensuite, des mutations du gène codant la  $\beta$ -glucuronidase (*GUS $\beta$* ) induisent l'apparition d'une maladie autosomale récessive rare, la mucopolysaccharidose de type VII (MPSVII, OMIM 253220) aussi appelée syndrome de Sly. La MPSVII fait partie de la famille des maladies de surcharge lysosomale et se caractérise par des dysmorphies crânio-faciales, un retard de croissance, hernie, retard de développement mental, une perte d'audition neurosensorielle et des infections fréquentes des voies respiratoires supérieures (Montano et al., 2016). L'atteinte squelettique serait due, au moins partiellement, à une suractivation de la voie mTOR et l'inhibition du processus d'autophagie (Bartolomeo et al., 2017).

Enfin certaines dysplasies squelettiques associées à des gènes connus pour réguler la plaque de croissance induisent des signes cliniques proches de ceux du syndrome de Keutel. C'est par exemple le cas du syndrome de dysplasie spondylométaépiphysaire (SMED SL-AC) (OMIM 271665) qui est une maladie autosomale récessive due à des mutations du gène codant *DDR2* (discoidin domain receptor tyrosine kinase 2). *DDR2* est une protéine capable de fixer le collagène de type X non fibrillaire et est impliquée dans le processus d'ossification

endochondrale (Leitinger et al., 2006 ; Mohamed et al., 2022). Les patients atteints de ce syndrome développent un retard de croissance, un raccourcissement des membres, une calcification anormale des cartilages (larynx, trachée et côtes) et un dysmorphisme facial (Borochowitz et al., 1993 ; Langer et al., 1993 ; Al-Gazali et al., 1996).

Ainsi la sous-expression ou la surexpression de nombreux facteurs de transcription, voies de signalisation ou processus cellulaires connus pour être impliqués dans l'ossification endochondrale peut engendrer des dysplasies squelettiques de gravités variables.

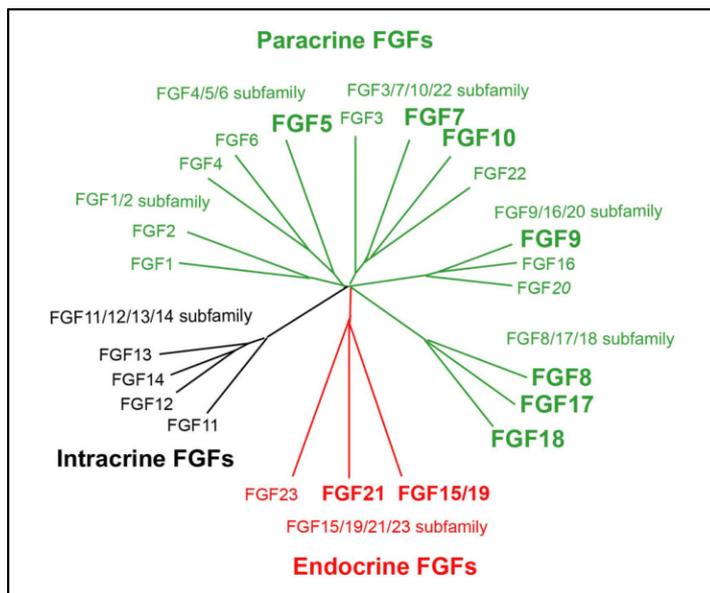
Les parties suivantes de ce manuscrit se proposent de décrire de manière plus précise 3 de ces acteurs majeurs : la signalisation aux FGFs et le cil primaire et l'autophagie, qui sont connus pour être impliqués dans la régulation du développement squelettique et dont les mutations conduisent à l'apparition de retard de croissance.

### 3.3. Rôle de la signalisation aux FGFs lors du développement squelettique

#### 3.3.1. La signalisation aux FGFs

Les Fibroblasts Growth Factors (FGFs) appartiennent à une famille de molécules à chaîne polypeptidique unique, qui compte 22 membres chez les Mammifères et qui sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires aussi bien chez l'embryon que chez l'adulte. Ces 22 membres, nommés FGF1 à FGF23 (FGF15 et 19 étant des orthologues chez les Vertébrés), sont répartis en 7 sous-familles selon leur homologie de séquence/structure. Selon un critère fonctionnel, ces familles peuvent être subdivisées en 5 sous-familles de FGFs paracrines, 1 sous-famille de FGFs endocrines et 1 sous-famille de FGFs intracellulaires (intracrines) (Figure 23) (Li et al., 2006 ; Ornitz et Itoh., 2015).

Les 4 FGFs intracellulaires sont capables d'interagir avec le domaine cytosolique C-terminal de canaux sodiques voltage dépendants (Nav). Les 18 FGFs restants, quant à eux, sont capables de se fixer à des récepteurs (FGFRs) à l'aide de co-facteurs à savoir l'héparine/héparane sulfate dans le cas des FGFs paracrines et à des membres de la famille Klotho pour les FGFs endocrines (Ornitz et Itoh, 2015).



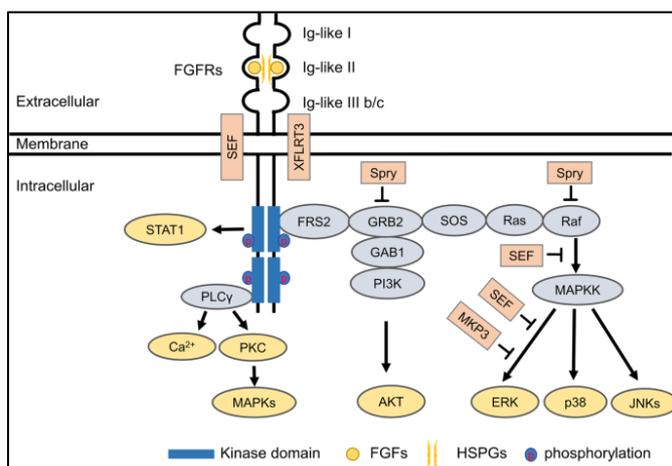
**FIGURE 23 : LES 7 SOUS-FAMILLES DE FGFs**

Les 22 FGFs identifiés chez les Vertébrés sont répartis en 7 sous-familles en fonction de la distance évolutive qui les séparent et 3 groupes selon leurs modalités d'action. Il existe ainsi 5 sous-familles de FGFs paracrines : FGF1/2, FGF 4/5/6, FGF3/7/10/22, FGF 9/16/20, FGF 8/17/18. Il existe également une sous-famille de FGFs intracrine : FGFs 11-14. Enfin, il existe une sous-famille de FGFs endocrines FGF 15/19/21/23. Adapté de (Itoh et al., 2016).

Les FGFRs sont des récepteurs de la famille des tyrosines kinases. Chez les Mammifères, il existe 4 FGFRs canoniques nommés FGFR1 à 4. Les FGFRs sont composés d'un unique domaine transmembranaire, d'un domaine extracellulaire de fixation de ligand et d'un domaine tyrosine kinase. Plus récemment, un récepteur FGFR1-like (FGFRL1 ou FGFR5) a été identifié, il se distingue des FGFRs canoniques par l'absence de domaine tyrosine kinase intracellulaire (Wiedemann et al., 2000 ; Ornitz et Itoh, 2015).

La fixation d'un ligand FGF sur son récepteur va provoquer sa dimérisation et la transphosphorylation des deux domaines kinases. Le récepteur ainsi activé va induire la phosphorylation et l'activation de protéines adaptatrices pour la transduction du signal via les voies RAS-MAPK, PI3K-AKT, PLC $\gamma$  et STAT. Ces voies de signalisation sont impliquées dans la régulation de la prolifération, de la différenciation et de la survie cellulaire. L'activation des voies RAS-MAPK et PI3K-AKT débute par la phosphorylation de la protéine adaptatrice FGFR substrate 2 $\alpha$  (FRS2 $\alpha$ ), présente au niveau de la région juxta-membranaire des FGFRs et ancrée

à la membrane plasmique. La FRS2 $\alpha$  phosphorylée se lie à une autre protéine adaptatrice nommée Growth factor receptor-bound 2 (GRB2) et à la tyrosine phosphatase SHP2. GRB2 permet l'activation de la voie RAS-MAPK par le recrutement de la protéine SOS et la voie PI3K-AKT par le recrutement de GAB1 (Kouhara et al., 1997 ; Hadari et al., 1998 ; Lamothe et al., 2004). L'activation des FGFRs induit également la phosphorylation de PLC $\gamma$ , ce qui entraîne l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate et la production d'inositol triphosphate (IP3) et de diacylglycérol (DAG). La production d'IP3 augmente la concentration intracellulaire d'ions calcium et le DAG va activer la protéinase Kinase C qui participe alors à l'activation de la voie RAS-MAPK (Mohammadi et al., 1992 ; Peters et al., 1992). Enfin, la liaison des FGFs à leurs récepteurs induit la phosphorylation et l'activation de la voie des STATs, notamment STAT1, STAT3 et STAT5 (Figure 24) (Suu et al., 1996 ; Deo et al., 2002 ; Yang et al., 2009 ; Dudha et al., 2010).



**FIGURE 24 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA SIGNALISATION AUX FGFs**

*La fixation d'un ligand FGF à son récepteur (FGFR) entraîne un changement de conformation de ce dernier vers sa forme activée. Sous cette forme, le FGFR va induire la phosphorylation de FRS2 $\alpha$  (FGFR substrate 2 $\alpha$ ), qui ira se lier à la protéine adaptatrice GRB2 (Growth factor receptor-bound 2). GRB2 va alors induire la voie Ras/Raf/MAPKs (dont ERK, p38 et les JNKs font parties) en interagissant avec les protéines SOS (Son of sevenless) et GAB1 (GRB2 associated binding protein 1). Les FGFRs sous leur forme activée sont également capables d'induire l'activité de PI3K (phosphatidylinositol (PI)-3 kinase), des protéines STATs (Signal Transducers and Activators of Transcription) et de PLC $\gamma$ . Les protéines transmembranaires SEF et XLRT3 sont capables d'interagir et de se lier directement avec les FGFRs. XLRT3 forme un complexe avec les FGFRs ce qui stimulera la signalisation aux FGFs alors que SEF est un inhibiteur de la voie MAPK ERK. D'autres protéines sont également impliquées dans la régulation de la voie des FGFs. C'est notamment le cas de Spry qui est capable de diminuer la signalisation aux FGFs en interagissant avec GRB2 ou Raf. De même, la protéine MKP3 peut inhiber la MAPK ERK en la déphosphorylant. Adapté de (Xie et al., 2020).*

Comme vu dans la partie 3.2.1, plusieurs dysplasies squelettiques sont liées à des dérégulations de la signalisation aux FGFs, tout particulièrement celle qui passe par FGFR3. Ceci indique que les FGFs jouent un rôle majeur dans le processus d'ossification endochondrale.

### *3.3.2. Rôle de la signalisation aux FGFs dans le développement squelettique*

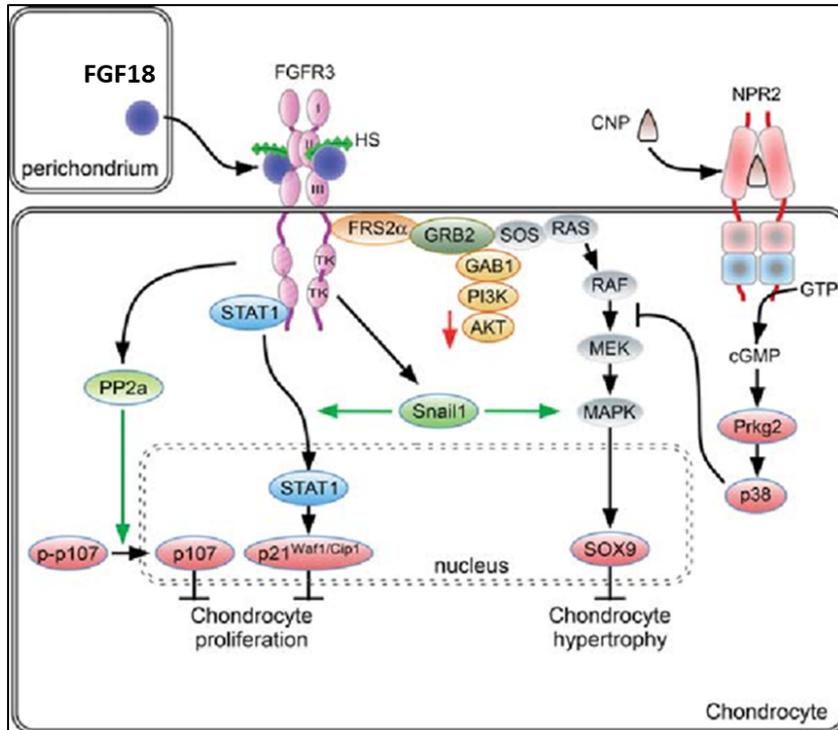
Lors des stades de développement embryonnaire et postnatal de l'ossification endochondrale, FGFR3 est exprimé au niveau des chondrocytes prolifératifs et pré-hypertrophiques (Iwata et al., 2000).

Durant le développement embryonnaire, la signalisation par FGFR3 est impliquée dans la condensation et la différenciation des cellules mésenchymateuses en favorisant l'expression de *Sox9*. De manière réciproque, SOX9 est capable de stimuler l'expression de *Fgfr3* au sein des chondrocytes immatures, ce qui va favoriser leur prolifération. Il a en effet été montré, par le biais d'expériences de RNAseq sur des chondrocytes costaux murins, que le promoteur du gène codant FGFR3 contient des éléments de fixation SOX9 spécifiques dans sa région promotrice. Il existe ainsi une boucle de rétrocontrôle positif entre FGFR3 et SOX9 dans les chondrocytes immatures (Shung et al., 2012 ; Oh et al., 2014). Au niveau de ces chondrocytes, la signalisation par FGFR3 est activée grâce aux FGF9 et FGF18 exprimé au niveau du tissu mésenchymateux avoisinant (Iwata et al., 2000 ; Liu et al., 2002 ; Ohbayashi et al., 2002 ; Hung et al., 2007 ; Havens et al., 2008).

A l'inverse, pendant le développement squelettique post-natal FGFR3 va inhiber la prolifération et la maturation des chondrocytes (Iwata et al., 2000). Cette inversion dans le rôle de la signalisation par FGFR3 permettrait d'expliquer le phénotype chondrocytaire observé lors du développement osseux pré-pubertaire observé chez les patients présentant des mutations gain-de-fonction au niveau du gène codant FGFR3 (Chen et al., 1999 ; Colvin et al., 1996 ; Deng et al., 1996 ; Li et al., 1999 ; Naski et al., 1999 ; Pannier et al., 2010).

Dans les chondrocytes de la plaque de croissance, la signalisation par FGFR3 va activer plusieurs voies de signalisation dont STAT1, ERK1/2 (acteurs de la voie RAS-MAPK) et p38 ; stimuler l'expression de Snail 1 (activateur de STAT1 et de la voie RAS-MAPK), de la Protein

phosphatase 2 (PP2a) et diminuer l'activité d'AKT (Figure 25) (Su et al. 1997 ; Laplantine et al. 2002 ; Raucci et al. 2004 ; Priore et al. 2006 ; de Frutos et al. 2007 ; Kolupaeva et al. 2008 ; Kurimchak et al. 2013).



**FIGURE 25 : IMPACT DE LA SIGNALISATION PAR FGFR3 SUR LES CHONDROCYTES LORS DU DEVELOPPEMENT POST-NATAL**

La liaison de FGF18, provenant du périchondre, au niveau du récepteur FGFR3 va activer les voies de signalisation MAPK et STAT1. Ces voies de signalisation vont induire l'activité des protéines p107 et p21<sup>Waf1/Cip1</sup> qui vont inhiber la prolifération des chondrocytes et du facteur de transcription SOX9 qui va inhiber l'hypertrophie des chondrocytes. Adapté de (Ornitz et Marie., 2015).

Plusieurs études semblent indiquer que l'inhibition de la prolifération et de la maturation des chondrocytes impliquerait des mécanismes indépendants l'un de l'autre.

L'inhibition de la prolifération des chondrocytes médiée par FGFR3 serait due à l'augmentation de l'expression de p21<sup>Waf1/Cip1</sup> (inhibiteur de la progression du cycle cellulaire) par STAT1 et l'activation de p107/P130 grâce à leur déphosphorylation par PP2a (Cobrinik et al. 1996 ; Su et al. 1997 ; Aikawa et al. 2001 ; Laplantine et al. 2002 ; Dailey et al. 2003 ; Legeai-Mallet et al. 2004 ; Kolupaeva et al. 2008, 2013). De plus, il été montré, dans des modèles de souris présentant des mutations gain-de-fonction au niveau du gène *Fgfr3*, que la

délétion de STAT1 permettait de corriger la prolifération des chondrocytes mais pas l'hypertrophie anormale des chondrocytes. Il est proposé que la voie MAPK serait responsable, au moins partiellement des anomalies de maturation des chondrocytes (Murakami et al., 2004).

En effet, des expériences menées sur des modèles de souris achondroplasiques ont montré que l'expression du peptide natriurétique de type-C (CNP), inhibiteur de la voie MAPK était capable de diminuer la sévérité de la pathologie en restaurant l'hypertrophie des chondrocytes. L'action de CNP a été montrée comme indépendante de la voie STAT1 et n'a pas d'impact sur la prolifération des chondrocytes (Yasoda et al., 2004)

Les anomalies observées au niveau de l'hypertrophie des chondrocytes pourraient impliquer un maintien de l'expression de SOX9 au niveau des chondrocytes hypertrophiques par la signalisation FGFR3 (Murakami et al. 2000 ; Shung et al. 2012 ; Zhou et al. 2015). L'activation de p107 par PP2a pourrait également être impliquée dans la régulation de l'hypertrophie des chondrocytes (Kolupaeva et al. 2013 ; Kurimchak et al. 2013).

De plus, l'implication des voies STAT1 et MAPK dans l'inhibition de la prolifération et de l'hypertrophie des chondrocytes pourrait expliquer la forte expression de SNAIL1, activateur de ces deux voies, constatée chez les patients atteints de dysplasie thanatophore (de Frutos et al., 2007).

L'interconnexion avec d'autres voies de signalisation impliquées dans la régulation de la plaque de croissance pourrait être un mécanisme indirect de la régulation de la plaque de croissance par FGFR3. En effet, la comparaison de modèle de souris achondroplasiques et des souris déficientes en FGFR3, les souris *Fgfr3*<sup>-/-</sup>, a montré que FGFR3 est capable de diminuer l'expression d'*Ihh*, *Pth1r*, *Bmp4* et *Bmp1ra* lors du développement post-natal de la plaque de croissance. Des expériences *in vitro* ont également montré que la surexpression de *Fgfr3* diminue l'expression de *Pth1r* et active la voie des Wnt via la phosphorylation du co-récepteur LRP6 par la voie des MAPK (Naski et al. 1998 ; Chen et al. 2001 ; Li et al., 2010 ; Krejci et al., 2012 ; Buchtova et al., 2015).

FGFR1, exprimé au niveau des chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques, est également impliqué dans la régulation de la maturation des chondrocytes. En effet, des modèles de souris déficientes en FGFR1 présentent une altération de l'hypertrophie des

chondrocytes lors du développement embryonnaire post-natal (Hung et al., 2007). A l'inverse, lors du développement post-natal, une déficience en FGFR1 résulte en une expansion de la zone hypertrophique (Jacob et al., 2006). Ainsi, à l'instar de FGFR3, le rôle de FGFR1 semble évoluer lors des différents stades du développement squelettique. Cependant, à l'heure actuelle, le rôle de FGFR1 reste mal caractérisé et requière des études plus approfondies.

De même FGFR4, qui est exprimé au niveau des zones quiescentes et prolifératives de la plaque de croissance, semble être impliqué dans le développement squelettique en coordination avec FGFR3. En effet, il a été démontré que les souris déficientes en FGFR3 et 4 présentent un phénotype exacerbé par rapport aux souris uniquement déficientes en FGFR3 (Weinstein et al., 1998).

Comme indiqué dans la partie précédente, ces 4 récepteurs présentent plus d'une vingtaine de ligands. Parmi ces ligands, FGF2, FGF9 et FGF18 sont ceux qui sont connus pour être les plus impliqués dans le développement squelettique.

FGF2 est l'un des premiers membres de la famille des FGF à avoir été caractérisé et est exprimé au niveau des chondrocytes quiescents et prolifératifs (Krejci et al., 2007). Il a été montré que la surexpression de FGF2 dans des explants de cartilages métatarsiens en culture induit une diminution de la prolifération des chondrocytes, de la mise en place de l'hypertrophie et enfin de la production de la matrice cartilagineuse (Mancilla et al., 1998). Des observations similaires ont pu être réalisées *in vivo*, par l'utilisation de modèles de souris surexprimant le FGF2 d'origine humaine. En effet, ces souris présentent un retard de croissance dû à une diminution de la prolifération des chondrocytes et une augmentation de l'apoptose médiée par STAT1 (Sahni et al., 2001).

FGF9 est exprimé au niveau du périchondre et des chondrocytes de la plaque de croissance en coordination avec son récepteur FGFR3. FGF9, par l'intermédiaire de FGFR3, est impliqué différemment dans la maturation des chondrocytes selon le stade du développement squelettique concerné. Ainsi, il a été montré que des souris déficientes en FGF9, les souris *Fgf9*<sup>-/-</sup> présentaient un raccourcissement des membres de type rhizomélisque à la suite de la condensation des cellules mésenchymateuses. Ces malformations squelettiques sont dues à une diminution de la prolifération des chondrocytes, un retard dans la mise en place de l'hypertrophie et une minéralisation osseuse aberrante (Hung et al., 2007). A l'inverse, lors du

développement squelettique post-natal, la surexpression de FGF9 conduit à une diminution de la prolifération des chondrocytes et du nombre de chondrocytes hypertrophiques (Garofalo et al., 2009).

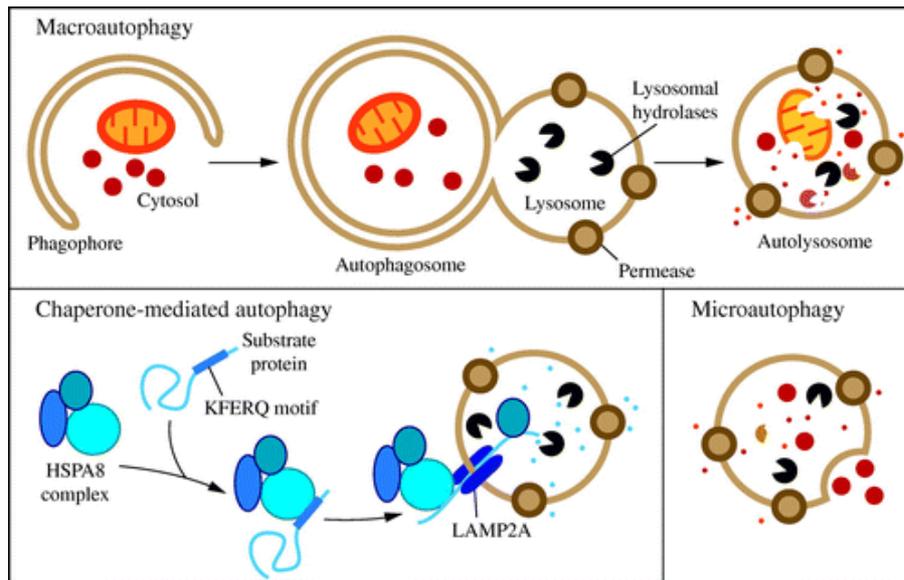
Enfin FGF18, ligand de FGFR3 et 4, exprimé au niveau du périchondre et de la plaque de croissance joue également un rôle dans la régulation de la plaque de croissance (Lazaus et al., 2007 ; Liu et al., 2002 ; Ohbayashi et al., 2002). En effet, il a été montré, dans les premières étapes de la chondrogenèse, que FGF18 stimule la chondrogenèse et active la voie des BMPs par l'inhibition de l'expression de Noggin, répresseur des BMPs (Shimoaka et al., 2002). De plus, il a été montré que les souris *fgf18*<sup>-/-</sup> présentaient des altérations de la plaque de croissance proches de celles observées chez les souris *fgfr3*<sup>-/-</sup> à savoir une expansion des zones prolifératives et hypertrophiques due à une augmentation de la prolifération et de la maturation des chondrocytes (Liu et al., 2002).

L'ensemble de ces résultats démontrent que la signalisation aux FGFs est un acteur majeur de la régulation du développement squelettique. D'autant plus que des études récentes ont montré que les FGFs sont également impliqués dans la régulation du processus d'autophagie, processus cellulaire indispensable à la survie des chondrocytes dans le micro-environnement avasculaire et hypoxique qu'est le cartilage de croissance.

## 3.4. Rôle de l'autophagie lors du développement squelettique

### 3.4.1. L'autophagie, définition générale et sous-types

L'autophagie est un mécanisme de dégradation et de recyclage cellulaire qui est conservé chez tous les Eucaryotes. Chez les Mammifères, il existe trois types d'autophagie : la micro-autophagie, l'autophagie médiée par des protéines chaperonnes (CMA) et la macro-autophagie. Bien que différents dans leurs mécanismes, les trois types d'autophagies aboutissent toutes au transport de protéines vers des lysosomes, ce qui aboutira à leur dégradation (Figure 26) (Yang et al., 2010).



**FIGURE 26 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES 3 TYPES D'AUTOPHAGIE PRESENTS CHEZ LES MAMMIFERES**

*La macroautophagie implique la formation de novo de vésicules cytosoliques à double membrane nommées autophagosomes, qui vont transporter les protéines à dégrader jusqu'aux lysosomes. L'autophagie médiée par des protéines chaperonnes permet le transport individuel de protéines dépliées au travers de la membrane lysosomale. La microautophagie est un processus par lequel les protéines cibles sont directement transportées à l'intérieur des lysosomes par invaginations membranaires. Adapté de (Parzych et al., 2014).*

Premièrement, la micro-autophagie correspond au processus par lequel les composants du cytoplasme vont être incorporés dans des lysosomes par des invaginations et/ou déformations de la membrane lysosomale (Marzella et al., 1984). La micro-autophagie est principalement impliquée dans la régulation de la taille des organelles, l'homéostasie de la membrane plasmatique et la survie cellulaire en cas de restriction en azote (Li et al., 2012).

Le second type d'autophagie est l'autophagie médiée par des protéines chaperonnes (CMA) qui est un mécanisme exclusif aux cellules de Mammifères. Contrairement aux deux autres types d'autophagie, la CMA est un processus ciblé. En effet, tous les substrats protéiques de la CMA comportent le pentapeptide KFERQ (Dice et al., 1990). Les protéines qui comportent ce motif seront alors transportées vers la membrane lysosomale puis « linéarisées » à l'aide de protéines chaperonnes telles que la Heat shock protein 70 kDa 8 (HSPA8/HSC70). Une fois linéarisées, les protéines cibles interagiront avec la Lysosomal associated membrane protein 2A (LAMP2A) qui permettra leur translocation au sein du lysosome, où elles finiront par être dégradées (Chiang et al., 1989 ; Cuervo et al., 1996). La CMA est principalement impliquée

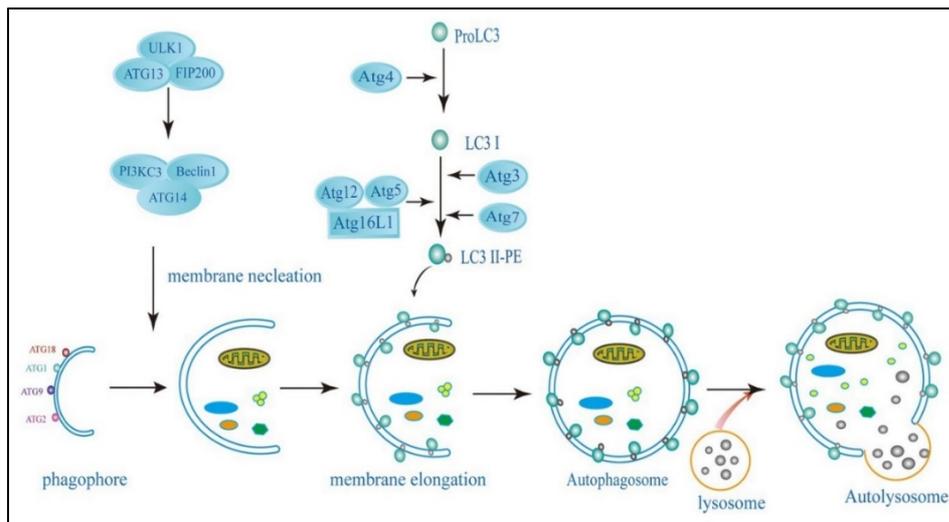
dans le maintien de l'homéostasie protéique au niveau neuronal, pulmonaire, musculaire ou cardiaque (Carra et al., 2008 ; Gamerdinger et al., 2009 ; Arndt et al., 2010 ; Ulbricht et al., 2013).

Enfin, le dernier type d'autophagie, la macro-autophagie est le processus autophagique le plus connu et étudié. Par consensus, le terme « autophagie » désigne généralement la macro-autophagie. Ce processus se distingue par le fait que le site de séquestration initial des protéines est éloigné de la membrane lysosomale et implique la formation de vésicules cytosoliques chargées de transporter les protéines séquestrées vers les lysosomes. Ces vésicules de transport, nommées autophagosomes, se caractérisent par le fait qu'elles soient formées *de novo* et non pas à partir de bourgeonnements membranaires (Yang et al., 2009). Chez les Mammifères, la formation de l'autophagosome est initiée au niveau de plusieurs sites cytoplasmiques et non au niveau d'un site d'assemblage unique comme chez la levure (Yla-Anttila et al., 2009 ; Hayashi-Nishino et al., 2009 ; Chen et al., 2011).

### ***3.4.2. Mécanismes moléculaires de l'autophagie***

L'autophagie est un processus cellulaire complexe dont le bon fonctionnement requiert de nombreux acteurs moléculaires (Figure 27).

Chez les Mammifères, l'initiation de l'assemblage des autophagosomes est contrôlée par un complexe protéique comprenant un membre de la famille Unc-51 like kinase (ULK1 ou 2, homologue de la Autophagy Related Protein 1, ATG1 présente chez la levure), ATG13, et la protéine RB1-induciblecoiled-coil 1 (RB1CC1/FIP200, possible orthologue de la protéine de levure ATG17). MTORC1 est impliqué dans l'activité de ce complexe selon la richesse en nutriments du milieu. En effet, lorsque le milieu est riche en nutriments, MTORC1 va s'associer au complexe, phosphoryler ULK1/2 et ATG13, ce qui les inactivera. A l'inverse, si le milieu est appauvri en nutriments, MTORC1 se dissociera du complexe, puis les protéines ULK1/2 et ATG13 seront activées par l'action de phosphatases (Hara et al., 2008 ; Ganley et al., 2009 ; Hosokawa et al., 2009 ; Jung et al., 2009).



**FIGURE 27 : MECANISMES MOLECULAIRES DE LA MACRO-AUTOPHAGIE**

L'initiation de l'assemblage des autophagosomes se fait par l'intermédiaire des complexes protéiques ULK1/ATG13/FIP200 et PI3KC3/Beclin1/ATG14. Ensuite l'étape d'élongation de l'autophagosome est contrôlée par deux systèmes : le système ATG4/ATG3/ATG7 et le système ATG5/ATG12/ATG16L1. Ces deux complexes sont impliqués dans la production de la forme mature de la protéine LC3 conjuguée à de la phosphatidyléthanolamine lipidique (LC3 II-PE) qui permettra l'élongation des membranes de l'autophagosome. Une fois formé, l'autophagosome va transporter des protéines, organelles ou microorganismes présents dans le cytoplasme vers un lysosome. L'autophagosome fusionnera avec un des lysosomes formant ainsi un autolysosome. Enfin, le contenu de l'autolysosome sera dégradé par l'action d'enzymes hydrolytiques. Adapté de (Wu et al., 2020).

Ensuite, un autre complexe protéique contenant notamment la protéine ATG14 ; la Bécline 1 (BECN1) et la phosphatidylinositol 3-kinase de classe III (PtdIns3K) sera recruté au niveau du site de formation de l'autophagosome. La PtdIns3K permettra de générer du phosphatidylinositol-3-phosphate (PtdIns3P) qui est indispensable au processus de macro-autophagie chez les Eucaryotes. Plusieurs protéines sont impliquées dans la régulation de l'activité de cette kinase. Ainsi, la protéine anti-apoptotique BCL2 ou la protéine KIAA0226/Rubicon sont capables d'inhiber la PtdIns3K en se liant à BECN1. A l'inverse, les protéines AMBRA1 et SH3GLB1/Bif-1 vont favoriser l'activité de PtdIns3K en interagissant avec BECN1 (Liang et al., 1998 ; Pattingre et al., 2005 ; Kihara et al., 2001 ; Furuya et al., 2005 ; Fimia et al., 2007 ; Takahashi et al., 2007, 2009 ; Matsunaga et al., 2009 ; Zhong et al., 2009 ; Burman et al., 2010 ; Itakura et al., 2008, 2010).

L'élongation de l'autophagosome est médiée par deux systèmes associés à des protéines Ubiquitine-like (UBL). Le premier système implique la conjugaison irréversible d'ATG5 et ATG12 par l'action des ubiquitine ligases ATG7 et ATG10. Le conjugué ATG5-ATG12 va ensuite fixer une troisième protéine nommée ATG16L1 par le biais d'ATG5. ATG16L1 va ensuite se dimériser, s'associer avec le phagophore et permettre l'expansion de sa membrane. Ce complexe est régulé par les protéines RAB33A, inhibiteur de ATG16L1 et l'acétyltransférase KAT2B/p300, capable d'acétyler et inhiber ATG5, ATG7 et ATG12 (Kim et al., 1999 ; Shintani et al., 1999 ; Ohsumi et al., 2001 ; Mizushima et al., 2003, 2007 ; Itoh et al., 2008 ; Lee et al., 2009). Le second système impliqué dans l'élongation est le système LC3 (homologue de la protéine de levure ATG8). La protéine LC3 va être clivée par l'action de la protéase à cystéine nommée ATG4, ce qui permettra d'exposer un résidu glycine au niveau de son extrémité C-terminale. La forme clivée de LC3, nommée LC3-I sera ensuite prise en charge de manière séquentielle par les ubiquitines ligases ATG7 et ATG3 puis se retrouvera conjuguée à de la phosphatidyléthanolamine lipidique (PE) par l'action du conjugué ATG5-ATG12. La forme conjuguée au PE se nomme LC3-II et est capable de se fixer au phagophore pour participer à l'élongation de sa membrane (Kirisako et al., 1999 ; Ichimaru et al., 2000 ; Hanada et al., 2007 ; Fujita et al., 2008 ; Gebg et al., 2008). ATG9, une protéine transmembranaire capable de changer de position et de se multimériser est également impliquée dans le processus d'élongation de la membrane de l'autophagosome. L'activité d'ATG9 est dépendante d'ULK1, et de la PtdIns3K, et est inhibée par MAPK14/p38 $\alpha$  (Reggiori et al., 2004 ; Young et al., 2006 ; He et al., 2008 ; Webber et al., 2010). Au fur et à mesure de l'agrandissement du phagophore, la membrane va se courber et fusionner pour aboutir à un autophagosome sphérique à double membrane.

Enfin, une fois l'autophagosome formé, celui-ci sera transporté vers le lysosome par un mécanisme dépendant des microtubules. Puis, l'autophagosome et le lysosome fusionneront pour donner un autolygosome. La fusion de ces vésicules implique plusieurs protéines dont VTIIB, RAB7 (qui est activée par phosphorylation via PtdIns3K), VAM7, VAM9 et la syntaxine 17 (Atlashkin et al., 2003 ; Jager et al., 2004 ; Fader et al., 2009 ; Monastyrska et al., 2009 ; Furuta et al., 2010 ; Itakura et al., 2012). Au sein de l'autolygosome, l'exposition à des hydrolases et à un pH acide aboutira à la dégradation de la membrane interne de l'autophagosome puis des protéines qu'il contient. Les composants issus de cette dégradation

seront ensuite exportés vers le cytoplasme via des perméases lysosomales afin d'être recyclés pour la biosynthèse ou pour le métabolisme énergétique.

Il existe également une forme spécifique de macro-autophagie qui est impliquée dans l'homéostasie et la maintenance cellulaire, par la dégradation de protéines spécifiques, des organelles ou même des bactéries (Chen et al., 2011 ; Isakson et al., 2013).

L'un des substrats le plus connu de l'autophagie sélective est p62/SQSTM1 (sequestome 1), une protéine ubiquitaire conservée au sein du règne animal. SQSTM1 est capable d'interagir directement avec LC3 et d'être incorporée au sein de l'autophagosome pour finalement être dégradée (Johansen and Lamark, 2011 ; Weidberg et al., 2011). Il a été montré que l'inhibition de l'autophagie conduit à la formation de large agrégats contenant p62 et de l'ubiquitine (Komatsu et al., 2007).

La protéine p62 est impliquée dans le devenir cellulaire. Elle est en effet capable de favoriser la survie cellulaire en activant la voie TNF receptor-associated factor (TRAF6)-NfκB ou bien la mort cellulaire en facilitant l'initiation de la cascade des caspases. (Moscat and Diaz-Meco, 2009). De plus, il a été montré que p62 est capable de stabiliser Nrf2 et d'activer la transcription de gènes codant des protéines antioxydantes (Komatsu et al., 2010 ; Lau et al., 2010).

L'autophagie est ainsi un processus complexe et est impliquée dans la réponse au stress intra/extracellulaire pour favoriser la survie cellulaire. Ce processus est indispensable à la survie des chondrocytes dans l'environnement avasculaire et hypoxique que constitue le cartilage de croissance.

### *3.4.3. Rôle de l'autophagie dans la plaque de croissance*

Les chondrocytes de la plaque de croissance se sont adaptés à un environnement avasculaire et hypoxique. Il a été montré que lors de la maturation des chondrocytes, ces derniers vont connaître des changements au niveau de leur métabolisme énergétique. En effet, les chondrocytes prolifératifs produisent de l'énergie principalement par le métabolisme

oxydatif, alors que les chondrocytes hypertrophiques utiliseront la glycolyse anaérobie (Adams et al., 2002)

Il a ainsi été observé que les chondrocytes hypertrophiques expriment fortement le facteur de transcription induit par l'Hypoxie 1a (HIF1a) ainsi que les gènes codant pour la Bécline 1 et LC3, protéines impliquées dans l'autophagie (Bohensky et al., 2007).

Des études *in vitro* ont montré que la suppression de l'expression du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  induit une diminution significative de l'expression de BCN1 et LC3. De plus, cette même étude a montré que l'inhibition de l'autophagie au niveau de culture de chondrocytes augmente l'expression des facteurs pro-apoptotiques que sont la caspase 8 et BID (Bohensky et al., 2007 ; Terkhorn et al., 2007). Ensuite, il a été démontré que l'inactivation des gènes codant pour les protéines de l'autophagie ATG5 et ATG7 chez des modèles de souris induit la mort des chondrocytes via un mécanisme caspase-dépendant et conduit à l'apparition de retards de croissance modérés (Vuppalapati et al., 2015). Ainsi il semblerait que le processus d'autophagie, régulé par l'activité de HIF1a permette de retarder la mise en place de l'apoptose des chondrocytes prolifératifs et hypertrophiques. Des études complémentaires ont permis de démontrer que l'inhibition de mTOR au niveau des chondrocytes induit l'activation de LC3, activation indiquée par la réorganisation en granules ponctuelle au niveau de la zone hypertrophique (Srinivas et al., 2008). De manière réciproque, il a été observé une suppression de l'autophagie dans des cultures primaires de chondrocytes issus de modèle de souris présentant une mucopolysaccharidose de type VII qui surexpriment MTORC1. Cette surexpression de MTORC1 conduit à une l'hyperphosphorylation inhibitrice du complexe Beclin1-PtdIns3K empêchant alors la production de PtdIns3P et la formation des autophagosomes (Bartolomeo et al., 2017). A l'inverse, l'inhibition de l'AMPK par utilisation de siARNs induit une diminution de l'activité de LC3 (Srinivas et al., 2009).

La régulation de l'autophagie au niveau de la plaque de croissance est donc sous le contrôle de HIF1a, mTOR et de l'AMPK. L'autophagie est indispensable pour retarder le processus d'apoptose et permettre aux chondrocytes de terminer leur maturation.

Plus récemment, il a été montré que la suppression de l'autophagie inhibe la différenciation des cellules mésenchymateuses vers un phénotype chondrocytaire lors des premiers stades de l'ossification endochondrale. En effet, il a été montré que des cellules chondroprogénitrices

de la lignée ATDC5 n'exprimant pas ATG7, ne pouvaient pas produire les isoformes LC3I et II, accumulaient la protéine SQSTM1/p62 et présentaient une expression très faible de *Col2a1* (Horigome et al., 2019).

De plus, des études menées sur les souris déficientes en ATG7 ont montré que des altérations de l'autophagie en l'absence d'ATG7 induisaient l'axe PERK-ATF4-CHOP qui est associé au stress du réticulum endoplasmique. L'activation de l'axe PERK-ATF4-CHOP est impliqué dans l'augmentation de l'apoptose des chondrocytes et les retards de croissance observés en absence d'ATG7 (Kang et al., 2017). Chez ces souris déficientes en ATG7, il a également été observé une accumulation de glycogène ainsi qu'une réduction de la capacité de prolifération des chondrocytes en plus de l'augmentation de l'apoptose (Horigome et al., 2019). Il existe un type d'autophagie spécifique, nommée glycophagie qui permet la digestion des granules de glycogènes par les autophagosomes ce qui conduit à la libération de glucose (Kaur et al., 2015 ; Ueno et al., 2017). Ainsi lors de la suppression du processus d'autophagie, les chondrocytes prolifératifs pourraient présenter des difficultés à mobiliser le stock de glucose nécessaire à leur activité.

Ensuite, des études sur des souris présentant une forme rare de mucopolysaccharidose due à une mutation du gène codant la sulfatase SUMF1, les souris *Sumf1*<sup>-/-</sup>, ont montré l'importance de la désulfatation des protéoglycanes pour la mise en place de l'autophagie. En effet, la désulfatation des protéoglycanes est indispensable pour la dégradation de la matrice cartilagineuse. En l'absence de SMUF1, la désulfatation des protéoglycanes n'est pas possible ce qui conduit à une dérégulation de l'autophagie, un rétrécissement des zones prolifératives et hypertrophiques ainsi qu'une réduction du nombre de chondrocytes dans le cartilage de croissance (Settembre et al., 2008).

Plus récemment, il a été montré que la signalisation par FGFR3 est impliquée dans la régulation de l'autophagie. En effet, des études sur des cellules ATDC5 traitées avec du FGF2, ligand de FGFR3, ont montré une diminution des niveaux protéiques de LC3I et II en réponse à la stimulation de la signalisation aux FGFs. De plus, des expériences complémentaires ont démontré que la suractivation de FGFR3 diminue les niveaux protéiques du conjugué ATG5-ATG12 et qu'inversement l'inhibition de FGFR3 augmente la quantité d'ATG5-ATG12. Des expériences de co-immunoprécipitation ont également montré *in vitro*, que FGFR3 est capable d'interagir directement avec ATG5 et d'inhiber la formation du conjugué. Des expériences sur

des systèmes de croissance d'os en culture traités avec des inhibiteurs de l'autophagie (3-MA ou la chloroquine) ont montré des altérations du développement cartilagineux proches de celles de l'achondroplasie. Il a également été observé que la surexpression *in vitro* d'ATG5 permet de contrebalancer l'effet négatif de la suractivation de FGFR3 sur la viabilité et la maturation des chondrocytes (Wang et al., 2015).

Il est ainsi possible qu'une diminution de l'autophagie soit partiellement responsable des atteintes du développement squelettique qui se mettent en place lors de l'achondroplasie.

Enfin, il a été démontré que la signalisation aux FGFs est également capable d'induire l'autophagie dans les chondrocytes lors du développement post-natal. En effet, il a été observé dans les embryons de souris déficientes en FGF18, les souris *Fgf18*<sup>-/-</sup> et lors du développement post-natal des souris haploinsuffisantes en FGF18, les souris *Fgf18*<sup>+/-</sup> et des souris déficientes en FGFR4, les souris *Fgfr4*<sup>-/-</sup>, qu'il y avait une absence d'autophagie et une diminution de l'expression du collagène de type II au niveau de la plaque de croissance. De plus, l'activation pharmacologique de l'autophagie est capable de corriger les phénotypes des souris *Fgfr4*<sup>-/-</sup> et *Fgf18*<sup>+/-</sup>. Chez les souris *Fgf18*<sup>+/-</sup>, il a également été observé une diminution des niveaux protéiques de JNK1/2 kinase sans altération des autres membres de la voie MAPK. Des expériences ont permis de montrer que l'induction de l'autophagie par FGF18 se fait de manière JNK dépendante, en favorisant l'inhibition de BCL2 et l'activité de la PtdIns3K de (Cinque et al., 2015).

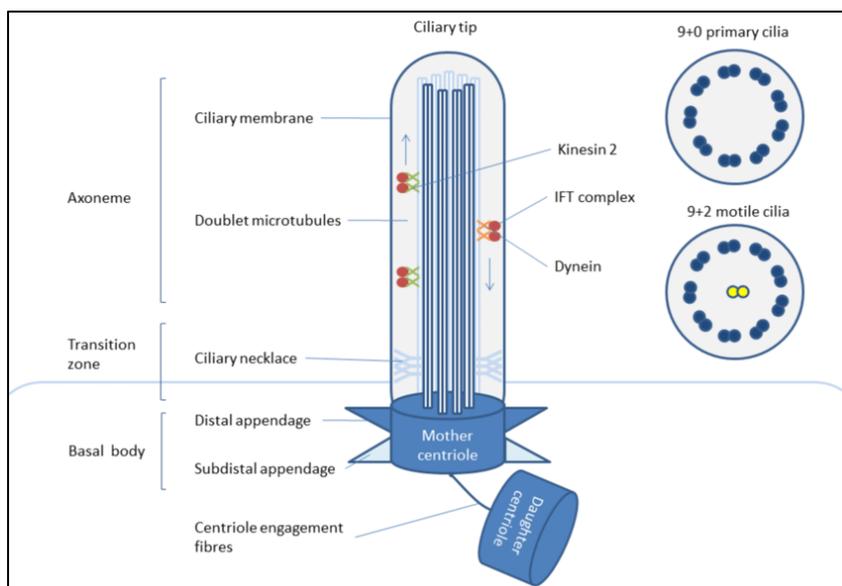
L'autophagie est donc un processus indispensable à la survie et à la maturation des chondrocytes au sein de l'environnement avasculaire et hypoxique qu'est la plaque de croissance.

Enfin, plusieurs études ont montré que la signalisation aux FGFs ainsi que l'autophagie interagissent tout deux avec le cil primaire, une structure cellulaire impliquée dans l'organisation de la plaque de croissance.

## 3.5. Rôle du cil primaire dans le développement squelettique

### 3.5.1. Caractéristiques du cil primaire

Le cil primaire est une organelle unique de forme allongée, présente à la surface de la plupart des cellules de Mammifères et qui présente des fonctions sensorielles et dans la motilité cellulaire (Satir et al., 2017). Le cil primaire comporte une partie saillante, l'axonème qui est issu de l'assemblage de 9 paires de microtubules. A l'inverse des cils motiles, le cil primaire est dépourvu de microtubules centraux (Park et al., 2019 ; Venkatesh et al., 2017). L'axonème est ancré à la membrane par un corps basal qui dérive des centrioles (Muhammad et al., 2012). Ces deux parties sont séparées par une zone de transition qui sert à contrôler la composition protéique des compartiments du cil primaire (Figure 28) (Reiter et al., 2017).



**FIGURE 28 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRUCTURE DU CIL PRIMAIRE**

*Le cil primaire est une organelle composée de deux parties : un corps basal, qui dérive des centrioles, assure l'ancrage à la membrane cellulaire et un axonème. Les deux parties du cil primaire sont séparées par une zone de transition. L'axonème du cil primaire est composé de 9 doublets de microtubules mais au contraire des cils motiles, il ne comporte pas de doublet de microtubule central. Un système de transport intraflagellaire impliquant les protéines motrices kinésine II et Dynéine II prend place au niveau de l'axonème. Ce système est impliqué dans l'assemblage/désassemblage du cil primaire ainsi que les fonctions sensorielles et de motilité de cette organelle. Adapté de (Williantarra et al., 2021).*

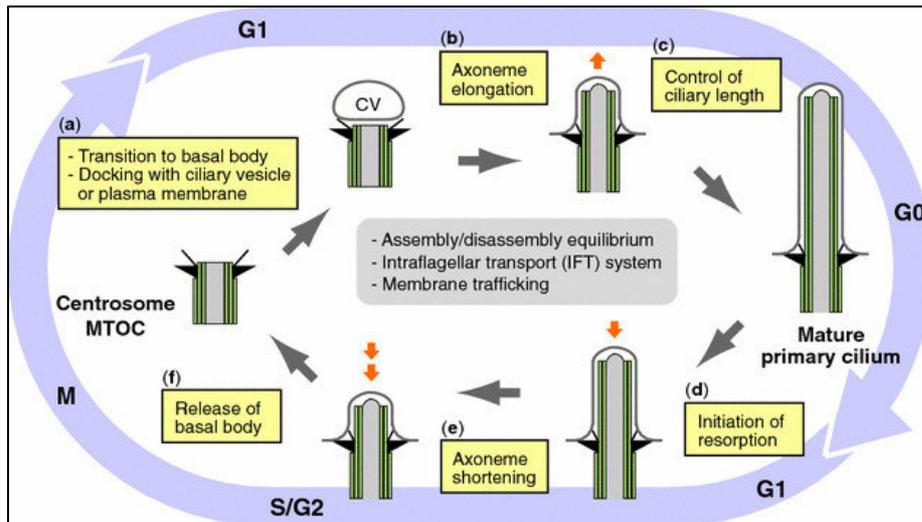
La formation du cil primaire, aussi appelé ciliogenèse, est un processus complexe et multiphasique qui prend place uniquement lors des phases G0/G1 du cycle cellulaire. Après la mitose, des centrioles satellites vont émerger du centriole mère, s'associer avec des triplets de microtubules pour former le corps basal. A la suite de la formation du corps basal, les premières étapes de la ciliogenèse pourront prendre place par l'intermédiaire de deux processus distincts, l'un intracellulaire et l'autre extracellulaire. La voie intracellulaire est caractérisée par l'amarrage de vésicules pré-ciliaires (provenant de l'appareil de Golgi) au niveau de l'extrémité distale du corps basal ce qui aboutira à la formation d'une structure en tige, aussi appelée vésicule ciliaire (Sorkin., 1962 ; Santos et al., 2008 ; Avasthi et al., 2012 ; Marshall et al., 2007 ; Ishikawa et al., 2011 ; Reiter et al., 2012 ; Izawa et al., 2015). De manière concomitante, le corps basal migrera vers la surface cellulaire et s'ancrera dans la membrane plasmique. La voie extracellulaire quant à elle, est caractérisée par un ancrage direct du corps basal à la membrane plasmique (Paridaen et al., 2013 ; Izawa et al., 2015). Ensuite, l'extension des microtubules centriolaires ainsi que le trafic de vésicules post-golgiennes permettront l'allongement de la structure en tige et aboutiront à la mise en place d'un axonème à double membrane (Wang et al., 2018).

Une caractéristique du cil primaire est qu'il s'agit d'une structure transitoire. En effet, il est désassemblé lorsque la cellule ré-entre dans le cycle cellulaire. Le désassemblage du cil primaire est un processus biphasique, la première phase débutera rapidement après l'entrée en phase G1, la seconde phase prendra place peu avant le début de la mitose (Figure 29) (Pugacheva et al., 2007 ; Tucker et al., 1979).

Lors du cycle cellulaire, la ciliogenèse (assemblage) et le désassemblage du cil primaire sont contrôlés par le système de transport intraflagellaire (IFT), un système motile bidirectionnel qui est connecté à l'axonème.

Premièrement, des protéines motrices IFT et des complexes protéiques vont se regrouper au niveau du corps basal. Ensuite, les protéines motrices hétérodimériques ou homodimériques Kinésine II (KIF3A/B et KIF17 respectivement chez les mammifères) seront activées et se lieront au complexe B de protéines IFT (qui comprend les 16 sous-unités IFT20, 22, 25, 27, 38, 46, 52, 54, 56, 57, 70, 74, 80, 81, 88, 172) pour assurer le transport de protéines dans le sens antérograde, c'est-à-dire du corps basal vers la pointe de l'axonème. Une fois les protéines transportées à destination, la Kinésine II sera inactivée et une autre protéine motrice, la

Dynéine 2 (DYNC2 chez les Vertébrés, elle comporte les sous-unités DYNC2-H1, DYNC-2LI1, DYNC-2I1 et LC8) sera activée et se liera avec le complexe A de protéines IFT (qui comprend les 6 sous-unités IFT 43, 121, 122, 139, 140, 144). La Dynéine II assurera le transport rétrograde vers le corps basal, ce qui permettra le recyclage des composants du système IFT dans le cytoplasme (Rosenbaum et al., 2002 ; Pedersen et al., 2008 ; Krock et al., 2009 ; Ishikawa et al., 2011 ; Prevo et al., 2017 ; Jensen et al., 2018).



**FIGURE 29 : ASSEMBLAGE ET DESASSEMBLAGE DU CIL PRIMAIRE EN COORDINATION AVEC LES PHASES DU CYCLE CELLULAIRE.**

a. Initiation de la ciliogenèse dans le cytoplasme, par l'association des centrioles avec des vésicules ciliaires (CV) d'origine golgienne lors de l'entrée de la cellule en phase G1. b. En phase G1/G0, l'assemblage et l'élongation de l'axonème se font au travers d'une coopération entre le système de transport intra flagellaire, le transport membranaire et l'importation de protéines spécifiques au niveau de la zone de transition. c. La longueur du cil primaire est déterminée par la balance assemblage/désassemblage du cil primaire. Le cil primaire atteint sa forme mature lors de la phase G0. d-e. Lorsque la cellule ré-entrera dans le cycle cellulaire, la balance assemblage/désassemblage va pencher en faveur du désassemblage du cil primaire. f. Enfin, le corps basal se dissociera du cil primaire, les centrioles ainsi libérés seront impliqués dans la formation des centres d'organisations des microtubules (MTOC) ou les pôles du fuseau mitotique. Adapté de (Izawa et al., 2015).

D'autres protéines motrices de la famille des kinésines, KIF2A et KIF24, sont impliquées dans le désassemblage du cil primaire avant le début de la mitose en entraînant la dépolymérisation des microtubules (Kim et al., 2015 ; Kobayashi et al., 2011 ; Miyamoto et al., 2015).

De façon intéressante, plusieurs études ont indiqué que l'autophagie était impliquée dans la régulation de la ciliogenèse. En effet, il a été montré que l'autophagie pouvait promouvoir la ciliogenèse lorsque la cellule se trouve hors du cycle cellulaire. La stimulation de la ciliogenèse passe par la dégradation de la protéine associée aux ciliopathies nommée OFD1 et qui est localisée au niveau de l'extrémité distale des centrioles et des satellites centriolaires (Tang et al., 2013). D'autres études démontrent, à l'inverse, que l'autophagie peut réguler négativement la ciliogenèse en dégradant la sous-unité IFT20 durant le cycle cellulaire (Pampliega et al., 2013).

#### *3.5.1.1. Fonctions du cil primaire*

D'un point de vue fonctionnel, le cil primaire est une organelle sensorielle qui comporte de nombreux canaux tels que PKD1, PKD2, TRPV4 et AC6 qui jouent un rôle important dans la mécano-transduction (Pablo et al., 2017 ; Spasic et Jacobs., 2017). Le cil primaire est également capable de détecter des signaux de stress extracellulaires et des variations de flux afin de réguler l'orientation gauche-droite lors du développement des organes. Il est aussi impliqué dans la détection de l'influx en ions calciques aux niveaux hépatique et rénal ou la détection de la production d'oxyde d'azote au niveau des cellules endothéliales (Wang et al., 2018)

De plus, le cil primaire comporte de nombreux récepteurs qui permettent la transduction de signaux des voies Hedgehog, Wnt, Notch, Hippo, TGF $\beta$ , mTOR, de récepteurs couplés aux protéines G ou de récepteurs tyrosine kinases (Eliott et Brugmann., 2018 ; Wheway et al., 2018).

L'un des rôles du cil primaire le plus connu et étudié est son implication dans la transduction des signaux de la famille Hedgehog.

En effet, il a été montré que la génération de souris mutées au niveau des gènes codant des protéines du système IFT (IFT88 ou 172) induit un phénotype semblable à celui des souris déficientes en Sonic Hedgehog (SHH) (Huangfu et al., 2003 ; Huangfu et Anderson., 2005).

Le modèle actuel propose qu'en absence de ligand Hedgehog, le récepteur Patched 1 (PTCH1) se retrouve à la base du cil primaire où il va inhiber l'activité des protéines transmembranaires

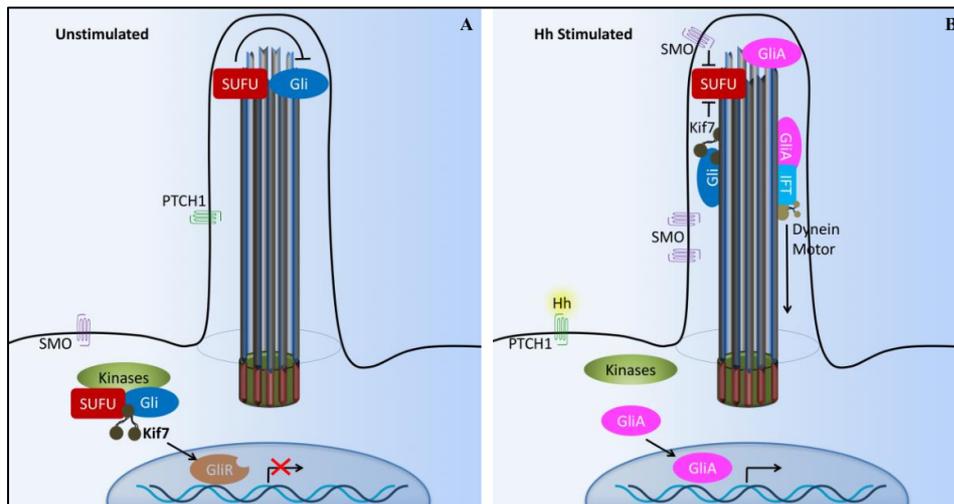
Smoothed (SMO) par des mécanismes encore inconnus (Rohatgi et al., 2007). De plus, à l'intérieur du cil primaire, le complexe protéique répresseur composé de Suppressor of fused (SUFU) va se lier aux facteurs de transcription GLI, le complexe SUFU-GLI sera alors transporté au niveau du corps basal. Les protéines GLI subiront alors de multiples phosphorylations par la PKA, la Casein kinase 1 (Ck1) et la Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) puis seront ubiquitinylées par une Ubiquitine-ligase E3 avant d'être clivées par le protéasome pour aboutir à la forme répresseur de GLI (GLIR) (Jiang and Struhl, 1995 ; Li, 1995 ; Hammerschmidt et al., 1996). Le complexe SUFU-GLIR va être transporté au niveau du noyau où il recrutera le complexe corépresseur SAP18-SIN3 pour inhiber l'expression des gènes cibles de la voie Hedgehog (Figure 30A) (Cheng et Bishop, 2002 ; Paces-Fessy et al., 2004). De même, lorsque la kinésine KIF7 est située au niveau de la base du cil primaire, celle-ci est capable de former un complexe avec les facteurs de transcription GLI et d'autres protéines. La localisation de KIF7 au niveau de la base du cil primaire empêche l'enrichissement du cil primaire en protéine Gli et favorise la mise en place des formes répresseurs de ces dernières (Pala et al., 2017).

En revanche, en présence d'un ligand HH, PTCH1 va être activé et se déplacer, ce qui permettra la levée de l'inhibition de SMO et sa translocation à l'intérieur du cil primaire. La translocation de SMO permettra alors la levée d'inhibition par SUFU et la génération des formes activateurs des facteurs de transcription Gli à l'aide de KIF7 par des mécanismes encore mal compris. Les protéines Gli seront ensuite transportées vers la base du cil primaire par la Dynéine II, puis passeront dans le noyau afin d'activer les gènes cibles de la voie Hedgehog (Figure 30B) (Corbit et al., 2005 ; Flegauf et al., 2007 ; Rohatgi et al., 2007 ; Tukaschinsky et al., 2010 ; Robbins et al., 2012).

Les sous-unités 1 et 2 du complexe ciliaire EvC (Ellis van-Creveld) nommées EvC1 et 2 sont deux protéines colocalisées au niveau du cil primaire et qui sont impliquées dans la régulation de la signalisation Hedgehog. Il est proposé que ces deux protéines sont capables de bloquer la signalisation Hedgehog entre les étapes d'activation de SMO et de génération de formes activateurs des Gli (Ruiz-Perez et al., 2000 ; Ruiz-Perez et al., 2003 ; Blair et al., 2011 ; Dorn et al., 2012).

Finalement, le cil primaire semble impliqué dans la régulation du processus d'autophagie. En effet, des études sur des modèles de cellules ont montré qu'une dérégulation du cil primaire

associée à une diminution de sa longueur induit l'inhibition de l'autophagie par l'activation de la voie mTOR (Pampliega et al., 2013 ; Wang et al., 2015).



**FIGURE 30 : TRANSDUCTION DE LA SIGNALISATION HEDGEHOG MEDIEE PAR LE CIL PRIMAIRE**

A. Inhibition de la transduction des signaux de la voie Hedgehog au niveau du cil primaire en absence de ligand. Cette inhibition est due à la conformation du récepteur PTCH1 qui bloque l'accès de la protéine SMO au cil primaire ainsi qu'à l'activité du complexe répresseur SUFU et la localisation de la kinésine KIF7 au niveau de la base du cil primaire qui favorise la mise en place des formes répresseurs des facteurs de transcription GLI (GLIR). B. Activation de la transduction de la voie Hegehog au niveau du cil primaire en présence de ligand. La fixation d'un ligand HH au niveau de PTCH1 entraîne un changement de conformation de ce dernier et la translocation de SMO au niveau du cil primaire. L'action conjuguée de SMO et de KIF7 au niveau de l'axonème favorise la mise en place des formes activateurs des protéines GLI. (GLIA) Les protéines GLIA vont ensuite être transportées vers la base du cil primaire par l'intermédiaire de la protéine motrice Dynéine II qui fait partie du système de transport intra flagellaire, puis au niveau du noyau afin d'activer les gènes cibles de la voie Hedgehog. Adapté de (Pala et al., 2017).

Ainsi, le cil primaire est une organelle sensorielle multifonctionnelle qui présente une régulation complexe et dépendante du cycle cellulaire. Le rôle du cil primaire, notamment dans la mécanotransduction et ses interactions avec de nombreuses voies de signalisation en font un régulateur clé du processus d'ossification endochondrale.

### 3.5.2. Rôle du cil primaire dans le développement squelettique

Le cil primaire est impliqué dans le processus d'ossification endochondrale par son rôle dans la régulation de la prolifération et de la maturation des chondrocytes.

En effet, dans des modèles de souris *Tg737orpk*, n'exprimant pas la protéine IFT88, il a été observé l'apparition de malformations squelettiques sévères telles que des raccourcissements des membres et une polydactylie. Ces malformations sont associées à une réduction de l'expression du collagène de type X, un délai dans la maturation des chondrocytes ainsi qu'une densité cellulaire plus faible dans la zone hypertrophique du cartilage de croissance (McGlashan et al., 2007). Ces souris déficientes en IFT88 présentent également un retard au niveau de la mise en place de la vascularisation osseuse (Haycraft et al., 2007).

De plus, il a été montré que le système de transport intraflagellaire est impliqué dans l'organisation en colonnes des chondrocytes de la plaque de croissance. Ainsi, des souris déficientes en la sous-unité KIF3A de la protéine motrice hétérodimérique Kinésine II présentent une altération de la morphologie et de l'orientation des chondrocytes prolifératifs ce qui entraîne une désorganisation de leur arrangement colonnaire. Cette désorganisation de la plaque de croissance est associée à une inhibition de la prolifération des chondrocytes et une accélération de l'hypertrophie des chondrocytes. Cette accélération de l'hypertrophie serait due, au moins partiellement, à la réduction significative de l'expression du récepteur de la voie Indian Hedgehog PTCH1 au niveau des chondrocytes pré-hypertrophiques lors du développement embryonnaire (Song et al., 2007).

De même, il a été démontré que les souris déficientes en la sous-unité IFT80 du complexe IFT B présentent une réduction sévère de la zone proliférative et une réduction légère de la zone hypertrophique associée à une diminution de la sécrétion de matrice extracellulaire. Ces souris présentent également une réduction de la signalisation Hedgehog du fait d'un blocage de l'activité du facteur de transcription Gli2 (Yuan et Yang., 2015).

Le récepteur couplé aux protéines G nommé GPR161, présent au niveau du cil primaire, est impliqué dans la régulation de la voie de signalisation Indian Hedgehog. En effet, les souris déficientes en GPR161 présentent une diminution significative de l'expression de *Ihh* associée à une augmentation du nombre de chondrocytes prolifératifs et une accumulation de

chondrocytes quiescents. Cette étude suggère ainsi un rôle du récepteur ciliaire GPR161 dans la modulation de la différenciation des chondrocytes quiescents par l'intermédiaire de IHH (Tao et al., 2019).

De même, il a également été montré, dans des modèles murins et cellulaires d'achondroplasie, qu'une suractivation de FGFR3 induit un raccourcissement du cil primaire et diminue la vélocité des systèmes de transport intraflagellaire antérograde et rétrograde. De plus, il a été observé que la suractivation de FGFR3 altère la transduction de la voie Hedgehog par le cil primaire en diminuant la translocation de SMO et en favorisant l'accumulation de la forme répresseur des facteurs de transcription Gli (Bosakova et al., 2019). La suractivation de FGFR3 impacte également le trafic des vésicules golgiennes médié par IFT20, qui est indispensable à l'assemblage du cil primaire (Martin et al., 2018). Ces résultats suggèrent que le phénotype squelettique observé chez les patients atteints d'achondroplasie pourrait impliquer des dérégulations du cil primaire et des voies de signalisation qui lui sont associées.

Enfin, le cil primaire est impliqué dans la réponse des chondrocytes aux contraintes mécaniques. En effet, il a été montré que le cil primaire des chondrocytes se courbe en réponse à un stress mécanique ce qui favorisera la production de matrice extracellulaire (Jensen et al., 2007). De plus, sous l'effet des contraintes mécaniques, la matrice cartilagineuse va se comprimer et se relâcher ponctuellement ce qui entrainera des changements de pression osmotique. En réponse à ces derniers, le cil primaire va se raccourcir et se positionner dans une invagination membranaire plutôt que de se projeter à la surface de la cellule (Rich et al., 2012). Le cil primaire est aussi impliqué dans la différenciation des chondroprogéniteurs en réponse à l'application de contraintes mécaniques. Des expériences sur des cellules ATDC5 présentant des altérations du cil primaire du fait de la suppression de l'expression d'*Ift88*, montrent une absence de stimulation de l'expression de collagène de type II, de collagène de type X et de BMP2 en réponse à un stress mécanique par rapport aux cellules contrôles (Ruhlen et al., 2014).

Le cil primaire est ainsi un acteur majeur du développement squelettique de par ses rôles dans la transduction de signaux, notamment de la voie Hedgehog et dans la réponse des chondrocytes aux contraintes mécaniques.

En conclusion, le développement squelettique est un processus complexe et multiphasique qui implique des dizaines d'acteurs moléculaires, voies de signalisation et processus cellulaires. Parmi eux, se retrouvent trois acteurs majeurs interconnectés : la signalisation aux FGFs, l'autophagie et le cil primaire. Ainsi, la moindre dérégulation d'une de ces voies peut avoir un impact sur les autres et conduire à l'apparition de dysplasies squelettiques.

Comme indiqué dans la partie 2 de ce manuscrit, MGP est une protéine qui est connue depuis plusieurs décennies comme impliquée dans le développement squelettique, comme le démontre le retard de croissance et l'ostéopénie que développent les souris MGP KO.

De plus l'apparition du phénotype squelettique précède la mise en place de calcifications anormales ce qui suggère un rôle de MGP autre que celui d'inhibiteur de la minéralisation.

Mais alors quels sont les informations actuellement connues de MGP lors du développement squelettique ?

### 3.6. MGP ET LE DEVELOPPEMENT SQUELETTIQUE

Comme indiqué auparavant, la protéine matricielle Gla a été découverte en 1983 dans de la matrice osseuse d'origine bovine (Price et al., 1983). Ce n'est que 5 ans plus tard, en 1988, que MGP a été identifiée comme exprimé de manière équivalente au niveau du tissu cartilagineux (Hale et al., 1988).

Au niveau de la plaque de croissance, la protéine matricielle Gla est principalement exprimée au niveau des chondrocytes prolifératifs et dans une moindre mesure au niveau des chondrocytes hypertrophiques terminaux situés à la jonction os-cartilage (Luo et al., 1997). Des études sur des cellules de la lignée ATDC5 ont confirmé cette expression biphasique de MGP. De plus, l'inhibition de MGP par l'utilisation d'un antisérum spécifique induit l'apoptose chez les chondrocytes prolifératifs mais n'affecte pas la condensation des chondroprogéniteurs. Ensuite, l'inhibition de l'expression de MGP par la transfection des cellules ATDC5 avec des transcrits antisens induit l'apoptose des chondrocytes prolifératifs et hypertrophiques ainsi qu'une minéralisation excessive de la matrice extracellulaire (Newman et al., 2001).

Ces résultats suggèrent un rôle de MGP dans la survie des chondrocytes prolifératifs et hypertrophiques mais pas dans la condensation des cellules mésenchymateuses.

Ceci est en accord avec les observations *in vivo*, qui montrent une désorganisation de la plaque de croissance lors du développement post-natal mais pas d'altérations de la condensation des cellules mésenchymateuses ou de la chondrogenèse chez les souris MGP KO (Luo et al., 1997). D'autres expériences ont montré que des traitements de cultures primaires de chondrocytes de poulet avec la warfarine (antivitaminique K, cf. partie 1.2 de l'introduction) induisent une minéralisation excessive au niveau des chondrocytes hypertrophiques mais n'a pas d'impact sur l'apoptose (Yagami et al., 1999). Ainsi le rôle de MGP au niveau de la survie des chondrocytes pourrait être indépendant des résidus Gla. Il est intéressant de noter que la très récente étude menée sur le rôle des modifications post-traductionnelles dans l'activité anti-minéralisante de MGP au niveau vasculaire indique également que les résidus Gla ne semblent pas requis pour cette dernière (Parashar et al., 2022).

La surexpression de MGP dans des cellules ATDC5 induit également l'apoptose des chondrocytes prolifératifs mais pas des chondrocytes hypertrophiques, une réduction de la minéralisation de la matrice extracellulaire est cependant visible (Newman et al., 2001). De même, des expériences *in vivo* réalisées chez des embryons de poulets où MGP est surexprimée, ont montré qu'ils développaient un raccourcissement et un épaissement des membres associés à un retard dans la maturation des chondrocytes ainsi qu'une inhibition de la minéralisation de la matrice cartilagineuse (Yagami et al., 1999). Ces résultats indiquent un rôle prépondérant de la diminution de l'expression de MGP pour la maturation des chondrocytes.

Au niveau de la plaque de croissance aviaire, il a également été montré qu'une proximité des zones d'expression de MGP (zone hypertrophique terminale) et de BMP2 (zone pré-hypertrophique) était indispensable au processus d'ossification endochondrale en condition normale et de réparation de lésions (Dan et al., 2012). Ces résultats suggèrent un rôle de MGP dans la maturation des chondrocytes par son interaction avec BMP2.

Des études récentes ont montré que MGP fait partie des gènes qui sont régulés par l'hormone thyroïdienne au niveau des extrémités fémorales et suggère un rôle dans le développement

des centres d'ossification secondaires (cf. partie 3.1.3.D de l'introduction) (Gomez et al., 2022).

Ainsi, la régulation de l'expression de MGP lors des différentes phases de maturation des chondrocytes est indispensable au bon déroulement du processus d'ossification endochondrale. Cependant, les mécanismes d'action de la protéine Gla au niveau du cartilage demeurent mal compris.

Comme indiqué dans la partie 2.3 de manuscrit, la déficience en MGP, dans des modèles murins conduit à une diminution modérée de la densité osseuse (i.e ostéopénie) (Luo et al., 1997 ; Laurent et al., 2022). Ces dernières années plusieurs études ont tenté d'expliquer le paradoxe de l'effet de la déficience en MGP sur la minéralisation du tissu osseux.

Premièrement, il a été proposé que la réduction de la densité osseuse des souris MGP KO est dépendante du phénotype vasculaire. En effet, il a été observé qu'en plus des calcifications artérielles pathologiques, que les souris déficientes en MGP présentent une vascularisation osseuse anormale altérée avec des ramifications et des épaissement artériels anormaux. Ensuite il a été constaté que la correction du phénotype vasculaire, dans des modèles de souris *Mgp*<sup>-/-</sup> ; *SM22-Mgp* est suffisante pour restaurer une densité osseuse équivalente à celle des souris contrôles (Marulanda et al., 2017). Ceci démontre l'importance de l'axe os-vascularisation dans le maintien et le remodelage du tissu osseux.

Cette étude a également montré que des ostéoblastes crâniens en culture, issus de souris MGP KO, présentaient une augmentation de la déposition de minéraux ainsi qu'une augmentation de l'expression du gène codant l'ostéocalcine. De plus, les souris MGP KO présentent une augmentation modérée mais significative des niveaux d'ostéocalcine dans leur sérum. A l'inverse, l'expression d'autres gènes ostéoblastiques tels que *Runx2*, *Osx* ou *Col1a1* n'est pas modifiée en absence de MGP (Marulanda et al., 2017). Ces résultats suggèrent que l'ostéopénie qui se développe en absence de MGP serait due, au moins partiellement, à une augmentation de l'activité de l'ostéocalcine.

Plus récemment, une autre étude a proposé un rôle de MGP dans la régulation de la formation du tissu osseux par l'intermédiaire de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. En effet, des expériences réalisées sur la lignée de cellules ostéoblastes-like MG63 démontrent que la surexpression de MGP dans ces cellules induit une augmentation de leur prolifération, de la minéralisation de

la matrice extracellulaire et une augmentation des gènes ostéoblastiques Wnt3a,  $\beta$ -caténine et Runx2. A l'inverse, une suppression de l'expression de MGP dans les cellules MG63 induit une diminution de l'expression de ces mêmes gènes (Zhang et al., 2019). Ces résultats indiquent que MGP pourrait promouvoir la formation du tissu osseux en favorisant la prolifération et la différenciation des cellules ostéogéniques.

Enfin, il est proposé que MGP est impliquée dans l'autre composante du remodelage osseux, à savoir l'ostéoclastogenèse. En effet, au niveau de culture de macrophages de la moelle osseuse, il a été observé que la déficience en MGP favorise l'expression des marqueurs de différenciation ostéoclastique tels que ITGB3, CTSK ou ACP5 ainsi que le nombre de cellules présentant une activité ostéoclastique (i.e les cellules TRAP positives). A l'inverse, la surexpression de MGP dans ces cultures de macrophages va diminuer l'expression des gènes ostéoclastiques ainsi que le nombre de cellules TRAP positives. De même, la surexpression spécifique de MGP au niveau des cellules ostéoclastiques chez des modèles murins permet d'inhiber leur activité et d'augmenter la densité osseuse. La protéine matricielle semble capable de réguler l'ostéoclastogenèse en modulant le flux d'ions calciques intracellulaires et la signalisation par Src/Rac1 (Zhang et al., 2019).

Ainsi la déficience en MGP serait responsable de l'apparition d'ostéopénie du fait d'une dérégulation simultanée de l'ostéoblastogenèse et de l'ostéoclastogenèse.

En conclusion, la protéine matricielle Gla est un acteur majeur du développement squelettique par ses rôles dans la survie et la maturation des chondrocytes ainsi que dans le remodelage du tissu osseux.

De plus, ces dernières années de nombreuses études ont mis en évidence l'existence d'un lien entre la protéine matricielle Gla et le développement d'une pathologie articulaire bien connue : l'arthrose.

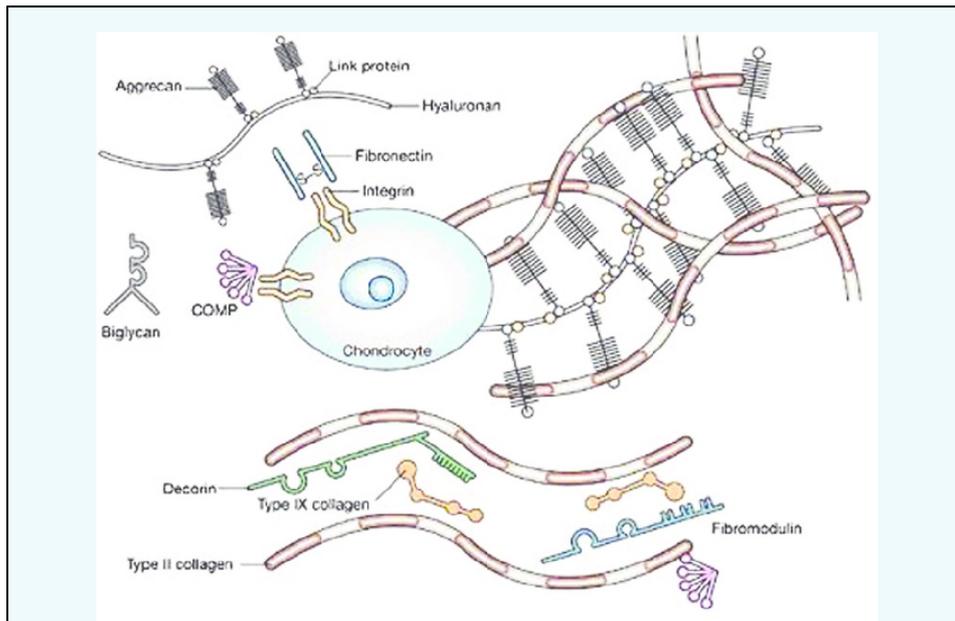
## 4. MGP et le développement de l'arthrose

### 4.1. Le cartilage articulaire

Le cartilage articulaire est un tissu connectif avasculaire, innervé et dépourvu de réseau lymphatique soumis à des nombreuses contraintes mécaniques. Son rôle au sein de l'articulation est d'assurer une résistance aux forces mécaniques compressives et de répartir les contraintes mécaniques tout en assurant un coefficient de friction le plus bas possible lors du mouvement (Wong et Carter., 2003 ; Fox et al., 2009).

Le cartilage articulaire est un cartilage de type hyalin de 2 à 4 mm d'épaisseur. Il est composé de chondrocytes particuliers, nommées chondrocytes articulaires qui sont contenus dans une matrice extracellulaire organisée en un réseau de fibres de collagène (principalement du collagène de type II mais aussi du collagène de type IX et XI) dont l'organisation varie selon la zone du cartilage considérée. Des agrégats de protéoglycanes chargés capables de capter des molécules d'eau sont présents au niveau du réseau de collagène. Ils permettront de former un hydrogel capable d'absorber les chocs que le cartilage pourrait subir. La matrice extracellulaire contient également de l'acide hyaluronique qui interagit avec plusieurs protéines telles que la fibronectine ou la protéine matricielle oligomérique du cartilage (COMP) et des glycoprotéines (Figure 31) (Buckwalter et al., 2005 ; Chen et al., 2006 ; Fox et al., 2009).

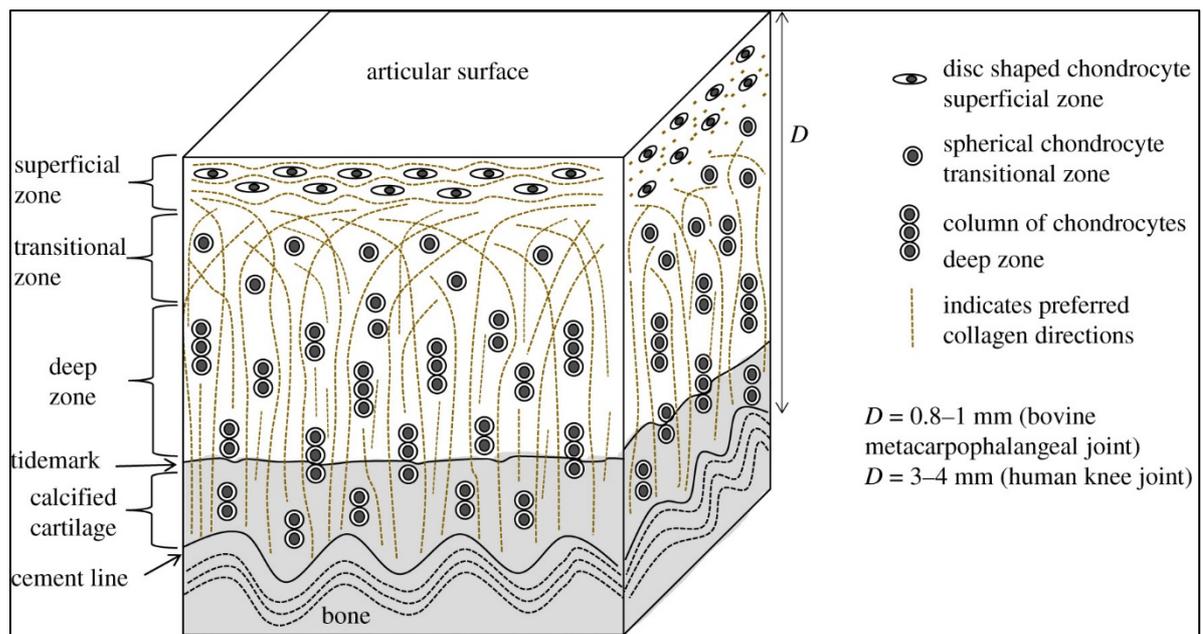
La matrice extracellulaire du cartilage articulaire est organisée en 4 couches caractérisées par une organisation spécifique de la matrice extracellulaire. La couche la plus externe, nommée couche superficielle est composée de fibres de collagène dont l'orientation parallèle permet une répartition optimale des contraintes mécaniques subit par le cartilage. La zone superficielle comprend également un grand nombre de chondrocytes, qui présentent un aspect aplati et produisent une protéine indispensable à la réduction du coefficient de friction : la lubricine (aussi appelée Protéoglycane 4, PRG4). Ensuite on retrouve la couche médiale, qui sert de zone tampon entre la couche superficielle et la couche profonde. Cette zone comporte une population de chondrocytes moins dense que la zone superficielle et qui présentent un aspect arrondi.



**FIGURE 31 : COMPOSITION DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE DU CARTILAGE ARTICULAIRE**

*La matrice extracellulaire du cartilage articulaire est composée de trois types de protéines : du collagène (essentiellement le collagène de type II), de protéoglycanes (principalement d'agrécane) et d'autres protéines telles que la Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) ou la fibronectine. L'interaction entre les charges négatives des protéoglycanes et le collagène de type II dotent le cartilage articulaire d'une résistance à la compression et à la traction. Adapté de (Fox et al., 2009).*

Dans cette zone médiale, les fibres de collagène présentent une orientation oblique, elles assurent ainsi une résistance contre la compression mécanique. Ensuite, on trouve la zone profonde caractérisée par une organisation colonnaire des chondrocytes, colonnes orientées perpendiculairement par rapport au front du cartilage articulaire. La matrice extracellulaire de la couche profonde est appauvrie en eau mais riche en protéoglycanes, elle contient les fibres de collagène les plus épaisses de tout le cartilage articulaire. Cette richesse en protéoglycanes permet une grande résistance aux forces mécaniques de compression. Enfin, la dernière couche est la couche calcifiée qui contient une faible population de chondrocytes hypertrophiques ainsi que des fibres de collagène orientées perpendiculairement par rapport à celles du cartilage articulaire. Ces fibrilles de collagène assurent l'ancrage du cartilage articulaire au niveau de l'os sous-chondral. Une zone irrégulière de fibrilles permet la démarcation entre la zone profonde et la zone calcifiée (Figure 32) (Buckwalter et al., 2005 ; Fox et al., 2009).



**FIGURE 32 : ORGANISATION DU CARTILAGE ARTICULAIRE**

*Le cartilage articulaire est organisé en 4 couches distinctes : la couche superficielle, la couche médiale, la couche profonde et la couche calcifiée. Adapté de (Mansfield et al., 2019).*

Le cartilage articulaire est donc une structure importante au sein de l'articulation, il permet d'assurer correctement le positionnement et le mouvement du système musculosquelettique ainsi que la résistance aux contraintes mécaniques qui en découlent. Tout atteinte au niveau articulaire aurait alors de sévères conséquences.

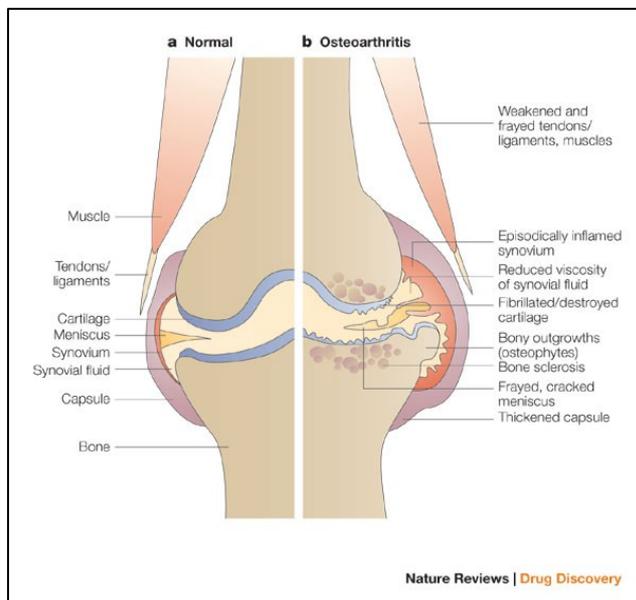
## 4.2. L'arthrose

L'arthrose est une maladie dégénérative musculosquelettique. Elle représente la pathologie articulaire la plus répandue avec près de 530 millions de personnes affectées dans le monde, dont plus de 10 millions uniquement en France (soit environ 15% de la population française totale). Depuis les années 1990, le nombre de cas a augmenté de 113%, cette augmentation serait principalement due à un vieillissement de la population et une augmentation des cas d'obésité (GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators, Lancet 2020).

L'arthrose est caractérisée par une dégradation du cartilage articulaire, une inflammation de la membrane synoviale (synovite), un remodelage de l'os sous-chondral, la formation d'ostéophytes (excroissance osseuse pathologique) et une réduction de l'espace articulaire (Figure 33) (Malemud et al., 2015).

L'arthrose peut se développer au niveau de n'importe quelle articulation du corps humain, les plus communément touchées étant les articulations du genou (gonarthrose), de la hanche (coxarthrose), et de la main (rhizarthrose).

De nombreux facteurs de risques peuvent favoriser le développement d'arthrose tels que l'obésité, le vieillissement, des facteurs héréditaires ou encore des antécédents de traumatismes articulaires (Vina et Kwoh., 2018).



**FIGURE 33 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES ALTERATIONS ARTICULAIRES DUES A L'APPARITION D'ARTHROSE.**

*A. Cartilage articulaire sain. B. Cartilage articulaire d'un patient atteint d'arthrose au niveau duquel se retrouvent : des lésions articulaires, des ostéophytes, une inflammation au niveau synovial, une atteinte ligamentaire et tendineuse, des fissures au niveau des ménisques, un rétrécissement de la capsule articulaire et une ostéosclérose (augmentation localisée ou diffuse de la densité osseuse). Adapté de (Wieland et al., 2005).*

Plus récemment, des études approfondies de la pathologie ont conduit à subdiviser l'arthrose en 3 grands phénotypes selon son origine : arthrose liée au vieillissement, arthrose post-traumatique et arthrose métabolique (Bijlsma et al., 2011). Elle peut également être classée

en fonction des phénotypes observés chez les patients : douleur chronique, syndrome métabolique, liée au métabolisme du cartilage/os, liée aux contraintes mécaniques, inflammatoire et enfin minimal joint disease (Dell'Isola et al., 2017).

De nombreux acteurs moléculaires et voies de signalisation impliqués dans le développement squelettique ont été associés à l'arthrose.

#### **4.2.1. La signalisation aux BMPs et l'arthrose**

Plusieurs études ont montré l'existence d'un lien entre la signalisation aux BMPs et le développement d'arthrose.

En effet, il a par exemple été montré que BMP2 et BMP4 sont exprimées au niveau des lésions arthrosiques et des ostéophytes (Nakase et al., 2003). Plus récemment, il a été observé que des modèles d'arthrose traumatique mis en place suite à une déstabilisation du ménisque médian (DMM) et de surexpression de BMP2 au niveau du cartilage, les souris *Col2-rtTA-TRE-BMP2*, présentaient des ostéophytes beaucoup plus développés que les souris contrôles. Cependant, aucune différence significative n'a pu être observée au niveau de la dégradation du cartilage (Davidson et al., 2015). D'autres études montrent que BMP2 joue un rôle de protection au niveau articulaire. En effet chez les souris qui n'expriment pas le gène *Bmp2*, l'apparition d'altérations au niveau des ménisques antérieurs et postérieurs a été observée. Ces altérations finissent par aboutir au développement d'un phénotype arthrosique (Gamer et al., 2018). Il a aussi été observé que chez des rats ayant subi une déstabilisation du ménisque médian, la réalisation d'exercices physiques modérés prévenait le développement de l'arthrose traumatique. Cette prévention par le biais de l'activité physique des rats a été associée à une augmentation de l'expression de gènes des BMPs au niveau des chondrocytes de la zone superficielle du cartilage articulaire (Ijima et al., 2016). Enfin l'injection intra-articulaire de BMP2 et de BMP7 en utilisant le système PODS (Polyhedrin Delivery System) semble améliorer la régénération du cartilage dans des modèles d'arthrose murins (Whitty et al., 2022).

#### 4.2.2. La signalisation aux FGFs et l'arthrose

Les FGFs sont également impliqués au niveau de l'arthrose notamment via la signalisation FGF18-FGFR3. En effet, comme indiqué dans la partie 3.2.3, lors du développement, FGF18 est capable de promouvoir la chondrogenèse via FGFR3. Des études ont montré que l'injection intra-articulaire de FGF18, chez des modèles de rats arthrosiques, stimule la régénération du cartilage (Moore et al., 2005). La forme recombinante humaine de FGF18 (rhFGF18), aussi connue sous le nom de Sprifermine® est actuellement le seul composé basé sur les FGFs en cours d'essais cliniques (Xie et al., 2020). Des études indiquent que la Sprifermine® possède une activité anabolique en stimulant la prolifération des cellules, en augmentant l'activité métabolique et en stimulant la synthèse de collagène de type II au niveau d'explants de cartilage ou de chondrocytes en culture (Gigout et al., 2017 ; Reker et al., 2017). Le rhFGF18 permet aussi de stimuler la régénération du cartilage en favorisant la synthèse de protéoglycanes, d'augmenter le nombre de cellules impliquées dans la réparation, de diminuer la dégradation des fibres de collagènes et l'apoptose au niveau d'explants de cartilage ayant subi des dommages mécaniques (impact) (Barr et al., 2014). D'autres études sur des explants de cartilage ont démontré que la Sprifermine® semble induire des changements de la matrice extracellulaire de manière biphasique. Dans un premier temps, rhFGF18 aurait un effet catabolique sur les chondrocytes en augmentant la dégradation de la matrice extracellulaire et en diminuant la synthèse de collagène de type II. Un changement s'opère ensuite et la Sprifermine® présente alors une activité anabolique comme décrit précédemment et favorise la synthèse de collagène de type II (Reker et al., 2020). La signalisation des FGFs est donc une nouvelle cible moléculaire dans le cadre du développement thérapeutique contre l'arthrose.

#### 4.2.3. Le cil primaire et l'arthrose

Le cil primaire semble également impliqué dans le développement de l'arthrose. En effet, il a été observé, dans des modèles murins n'exprimant plus la protéine de transport intraflagellaire 88 (IFT88) au niveau des chondrocytes articulaires, les souris *Col2aCre ; Ift88<sup>fl/fl</sup>* développaient des altérations du cartilage proches de lésions arthrosiques à des stades

précoces (P7). Les altérations du cartilage apparaissent au moment où les souriceaux commencent à se mouvoir et donc à subir des contraintes mécaniques au niveau articulaire. Une augmentation de gènes marqueurs de l'arthrose comme *Mmp13*, *Runx2* ou *Col10a1* est également observable chez ces souris. Ces altérations du cartilage sont associées à une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la voie de signalisation Indian Hedgehog (IHH) tels que *Ptch1* et *Gli1*. Au niveau protéique, il a été observé une diminution du ratio forme répresseur/ forme activateur de la protéine Gli3 également impliquée dans la signalisation par IHH (Chang et al., 2011 ; Coveney et al., 2022). La suractivation de la voie IHH au niveau des chondrocytes articulaires est connue pour induire le développement d'arthrose (Lin et al., 2009). Des études sur des souris déficientes en Galectine 3 (GAL3), une protéine exprimée au niveau du cil primaire, ont montré que ces souris développaient une arthrose de manière prématurée (Hafsia et al., 2020). A la suite d'expériences sur des chondrocytes isolés de modèles d'arthrose murins qui surexprimaient HIF2 $\alpha$ , il a pu être observé une diminution du nombre de cils primaires présents au niveau du cartilage articulaire. Ces résultats suggèrent une implication de la perte de cils primaires lors de l'arthrose, du fait de l'activation de la voie HIF2a/AURKA/NEDD9 (Yang et al., 2019).

D'autres études ont également démontré un rôle du cil primaire dans l'activité de cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-1 $\beta$ , cytokine connue pour être impliquée dans le développement de synovite. En effet, il a été observé que des chondrocytes traités à l'IL-1 $\beta$  présentent une augmentation de la longueur de leurs cils primaires et que dans des chondrocytes déficients en IFT88, la réponse au traitement est significativement réduite (Wann et al., 2011). Ces résultats indiquent que les cytokines pro-inflammatoires semblent capables de réguler la cillio-genèse. De plus, d'autres études ont montré que la stimulation mécanique d'explants de cartilage avait pour effet de contrebalancer l'activité d'IL-1 $\beta$ . Cette inhibition de l'activité d'IL-1 $\beta$  est due à l'activation de HDAC6, une tubuline désacétylase capable de réguler l'élongation du cil primaire et les voies de signalisation qui lui sont associées (Fu et al., 2019). L'ensemble de ces résultats suggère une implication du cil primaire dans la composante inflammatoire de l'arthrose.

#### 4.2.4. L'autophagie et l'arthrose

Les dérégulations du processus d'autophagie ont également été associées au développement de l'arthrose. En effet, au niveau du cartilage de patients atteints d'arthrose et dans des modèles arthrosiques de souris, il a pu être observé une diminution des niveaux protéiques de LC3B, la Becline 1 et ULK1, acteurs de l'autophagie (Caramès et al., 2010). Cette diminution de l'activité autophagique est associée à une accumulation de p62/SQSTM1 (Zheng et al., 2019). De plus, mTOR, inhibiteur de l'autophagie est surexprimé au niveau des lésions arthrosiques humaines ou de modèles murins d'arthrose. La délétion de mTOR au niveau du cartilage murin augmente l'activité autophagique et protège contre le développement d'arthrose induite par DMM (Zhang et al., 2014). Des expériences d'injections de rapamycine, inhibiteur de mTOR dans des modèles murins arthrosiques ont permis de montrer que l'activation de l'autophagie permet de diminuer la sévérité de l'arthrose (Caramès et al., 2012).

A l'inverse, une suppression de l'autophagie, comme chez les souris déficientes en ATG5 (*Atg5cKO*) conduit à un développement d'arthrose prématuré lors du vieillissement. Ce développement prématuré serait dû à une augmentation de la mort cellulaire des chondrocytes articulaires. Aucune différence significative n'est observable entre souris *Atg5cKO* et les contrôles dans des modèles d'arthroses post-traumatiques (Bouderlique et al., 2015).

Le développement de l'arthrose implique une modification de l'expression des micro-ARNs (miRNAs), ARNs de petite taille impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires dont le maintien du cartilage. Le micro-ARN nommé miR155 est l'un de ceux qui est le plus surexprimé au niveau du cartilage arthrosique. Des études ont montré qu'il est capable d'inhiber l'expression de plusieurs acteurs moléculaires de l'autophagie tels que ULK1, ATG14, ATG5, ATG3, LC3 ou encore FOXO3 (D'Adamo et al., 2016).

Ces résultats démontrent le rôle protecteur de l'autophagie lors du vieillissement.

En conclusion, la plupart des acteurs moléculaires majeurs de la régulation de la plaque de croissance jouent également un rôle dans le maintien du cartilage articulaire. De même, une

dérégulation de l'expression de ces acteurs conduit à l'apparition de pathologies articulaires telles que l'arthrose.

De fait, quel rôle tient la protéine matricielle Gla dans le développement de l'arthrose ?

### 4.3. MGP et l'arthrose

La première association entre vitamine K et le développement de l'arthrose a été faite il y a plus de 25 ans. En effet il a été observé que la concentration de vitamine K1 était diminuée dans le sérum de patients âgés atteints d'arthrose (Robert et al., 1996). Des études plus récentes ont déterminé que de faibles concentrations en vitamine K1 étaient considérées comme un facteur de risque pour le développement d'arthrose du genou. En effet, les patients atteints d'arthrose et ayant de faibles concentrations plasmatiques en vitamine K1 présentent une perte de cartilage et des dommages au niveau du ménisque plus important que les patients sans déficience en vitamine K (Misra et al., 2013 ; Shea et al., 2015). La prise d'anti vitamines K telles que la warfarine ou l'acénocoumarol est également un facteur de risque pour le développement d'arthrose du genou (Boer et al., 2021 ; Ballal et al., 2021).

En parallèle, il a été montré que le cartilage issu de patients atteints d'arthrose présente une diminution de l'expression de la  $\gamma$ -glutamyl carboxylase (GGCX) à la fois au niveau de l'ARNm et au niveau protéique (Shi et al., 2016). A l'inverse, la surexpression de GGCX dans des modèles d'arthrose post-traumatique de lapin (ACLT) induit une diminution de l'expression de marqueurs de l'arthrose tels que *Col10a1* ou *Mmp13*, réduit l'inflammation de l'articulation et stimule l'expression de *Col2a1* (Fu et al., 2017a). Des résultats similaires ont été obtenus à partir de culture de chondrocytes primaires surexprimant également GGCX (Fu et al., 2017b).

Il a été montré que les cultures de chondrocytes arthrosiques présentaient une quantité de la forme carboxylée de MGP (Gla MGP ou cMGP) plus faible que les chondrocytes sains. De même les chondrocytes arthrosiques ne sont pas capables de produire le complexe MGP-fetuin. Ceci pourrait expliquer la minéralisation anormale du cartilage lors du développement de l'arthrose (Wallin et al., 2011).

Des études ont associé le développement de l'arthrose de la main à des polymorphismes du gène codant pour la MGP. Durant cette étude, trois polymorphismes génétiques ont été testés : *rs1800802*, *rs1800801*, et *rs4236*. Il a été montré que le polymorphisme *rs1800802* et l'allèle *rs4236* étaient associés au développement de l'arthrose de la main. Cette étude n'a cependant pas mis en évidence de corrélation entre l'arthrose de la main et la concentration de MGP dans la circulation sanguine (Misra et al., 2011). Une autre étude a permis d'associer le polymorphisme *rs1800802* à un risque accru d'arthrose du genou dans la population chinoise. (Hui et al., 2019).

Des études d'associations pangénomiques (Genome wide association, GWAS) et fonctionnelles ont associé l'arthrose de la main à un autre polymorphisme nommé *rs4764133*, qui est localisé à proximité du gène codant MGP (Den Hollander et al., 2017). Des études complémentaires ont montré que ce polymorphisme est associé à une réduction de l'expression de MGP au niveau du cartilage, du tissu synovial et du tissu graisseux infrapatellaire. Le polymorphisme *rs1800801* a également été associé à une réduction de l'expression de MGP au niveau des chondrocytes. De manière plus générale, l'utilisation de la technique de RNAseq a permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression du gène codant MGP par les chondrocytes et au niveau de l'os sous-chondral, lors de l'initiation de l'arthrose. Cette augmentation de l'expression de MGP pour être un mécanisme de compensation visant à contrebalancer la calcification de la MEC. Les porteurs d'allèle de risque ne seraient alors pas capables de contrebalancer efficacement la calcification de la MEC, ce qui expliquerait leur prévalence accrue pour l'arthrose (Sherperd et al., 2019 ; Houtman et al., 2021).

Des études menées chez des patients traités aux antivitamines K présentant l'haplotype *VKORC1* BB, responsable de la suractivation de la vitamine K reductase et de l'allèle de risque MGP *rs1800801*, ont montré que ces patients avaient un risque 4 fois plus élevé de développer une arthrose en comparaison au groupe non traité et non porteur d'allèle à risque. En prenant en compte la différence de distribution de la vitamine K et la variation de l'effet des anti vitamines K selon le tissu considéré, il est proposé que les doses plus élevées prises par les patients ont un fort impact sur le cartilage articulaire (Price et al., 1987 ; Sato et al., 2002 ; Hara et al., 2005 ; Boer et al., 2021).

Enfin, il semblerait que des niveaux élevés de la forme non-carboxylée de MGP (GluMGP ou ucMGP) dans la circulation sanguine soient associés au développement de l'arthrose (Shilagi et al., 2012 ; Rafael et al., 2014). Cependant, une autre étude suggère plutôt une diminution de la concentration de ucMGP dans le sérum chez les patients atteints d'arthrose du genou (Bing et Weng ; 2015).

A l'instar de la GRP (cf. partie 1.2.2 de l'introduction), la protéine matricielle Gla est impliquée dans le développement d'arthrose. Le cycle de la vitamine K et les PVKDs sont ainsi des cibles moléculaires potentielles pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques contre cette maladie qui touche plus de 500 millions de personnes à travers le monde.

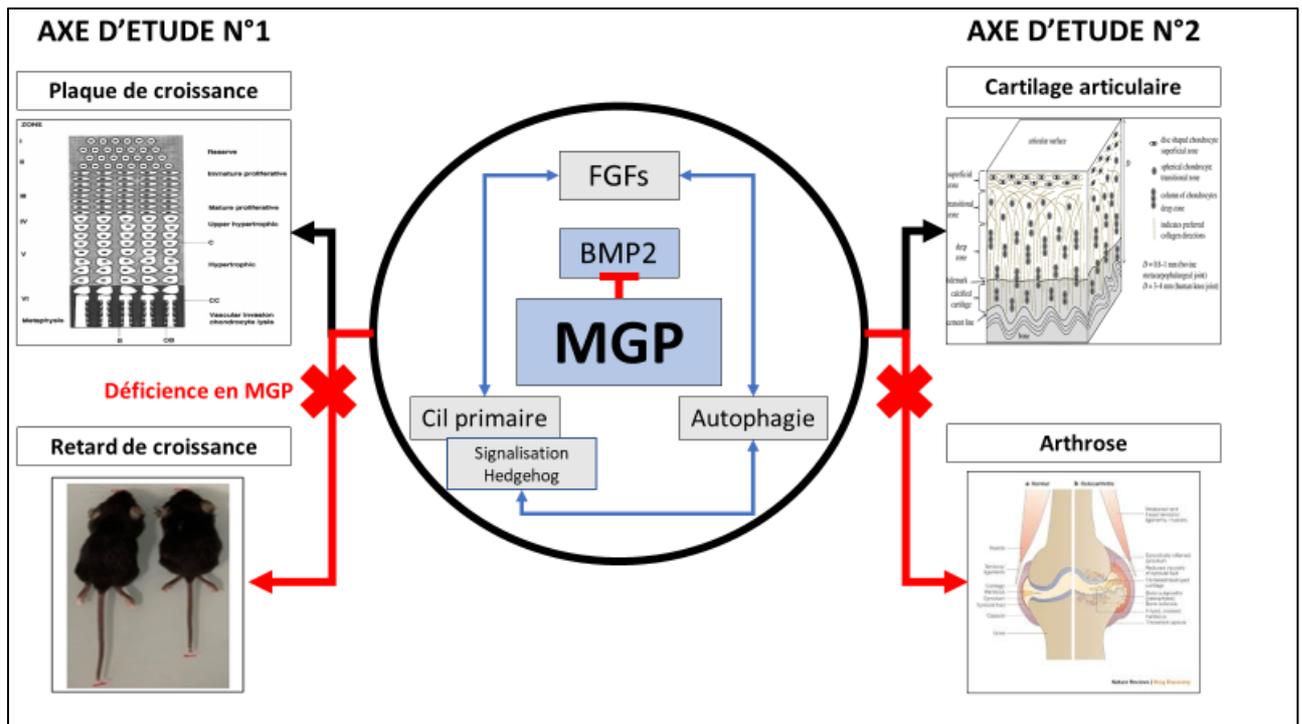
# Objectifs

Comme indiqué dans la partie Introduction de ce manuscrit, bien que l'implication de MGP dans le développement squelettique post-natal et de l'arthrose ait été observé, peu de données sont disponibles dans la littérature quant à ses modalités d'action au sein du cartilage.

C'est dans ce contexte que mon projet de thèse se propose, pour la toute première fois de décrire le rôle de MGP dans le tissu cartilagineux sain et pathologique.

Pour ce faire, nous avons déterminé 2 grands axes d'études :

1. Tout d'abord, nous avons proposés de réaliser des études *in vivo* dans le modèle murin de déficience en MGP, les souris MGP KO (ou *Mgp*<sup>-/-</sup>). Ces études incluent une description détaillée du retard de croissance modéré qui prend place chez ces souris. De plus, nous proposons d'étudier l'impact de la déficience en MGP sur plusieurs acteurs majeurs de la régulation du cartilage de croissance tels que FGFR3, la voie des BMPs, la signalisation Hedgehog ; le cil primaire et l'autophagie.  
En parallèle de l'étude du retard de croissance des souris MGP KO, nous avons décidé de mettre en place des expériences *in vitro* de modulation du phénotype de chondrocytes déficients en MGP par la voie des FGFs ou de la voie des BMPs. Ceci afin de mieux comprendre son possible rôle modulateur de ces différentes voies.
2. Nous avons également prévu d'étudier l'impact de la déficience en MGP sur la mise en place et le développement de l'arthrose à différents stades du développement post-natal murin (12, 15, 18, 20 et 24 mois).



**FIGURE 34 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES OBJECTIFS DE LA THESE**

*Etude du rôle de la protéine matricielle Gla au sein de la plaque de croissance et du cartilage artulaire. Il est intéressant de noter que ces deux types de cartilages présentent une structure proche avec une zone superficielle comprenant des chondrocytes d'aspect arrondis, puis une zone médiane avec des cellules organisées en colonnes et enfin une zone comportant des chondrocytes hypertrophiques associés à une calcification de la matrice extracellulaire (c.f partie 3.1.3 et partie 4.1 de l'introduction). De plus, la signalisation par les FGFs, le cil primaire et l'autophagie sont des acteurs majeurs de la mise en place et du maintien de ces structures cartilagineuses. Des dérégulations de ces voies sont connues pour induire des retards de croissances (et des dysplasies squelettiques au sens large) ainsi que pour être impliquées dans le développement de l'arthrose.*

# Matériels & méthodes



Dans un souci de mettre en évidence le lien entre les parties Méthodes et Résultats, des symboles ①, ②, ③ correspondant respectivement aux parties I, II, III des résultats ont été placés au niveau des protocoles expérimentaux correspondants.

## 1. Génération des souris MGP KO et entretien de la colonie

① ③

La létalité précoce des souris MGP KO (*Mgp*<sup>-/-</sup>) entre 6 et 8 semaines de vie, du fait de la calcification et de la rupture des artères (cf. partie 2.3 de l'introduction), ne permet pas la mise en reproduction de ces souris. Ainsi, les souris WT (*Mgp*<sup>+/+</sup>) et MGP KO (*Mgp*<sup>-/-</sup>) utilisées lors de ces travaux de thèse ont toutes été obtenues par des croisements de souris hétérozygotes (*Mgp*<sup>+/-</sup>) suivant la distribution mendélienne classique des allèles sauvages et mutés. Les souris hétérozygotes (*Mgp*<sup>+/-</sup>) à l'origine de cette colonie sont un don du Dr Monzur Murshed (McGill University, Montréal, Canada). La génération de l'allèle MGP muté par insertion d'une cassette néomycine (Luo et al., 1997) a été décrite dans la partie dédiée de ce manuscrit (cf. partie 2.3 de l'introduction). Originellement, les souris MGP présentaient un fond génétique mixte, elles ont ensuite été croisées pendant plus de 10 générations pour obtenir un fond génétique C57BL/6J pur. Afin de déterminer le génotype des souris, des biopsies sont réalisées au niveau auriculaire un jour avant que les souris n'atteignent le stade de développement requis. Les bouts d'oreilles ainsi prélevés sont digérés avec de la protéinase K à une concentration de 500 µg/ml (Proteinase K recombinant grade PCR, Roche) pendant 5 minutes à température ambiante afin d'en extraire l'ADN génomique. La protéinase K est ensuite dénaturée par traitement thermique à 98°C pendant 2 minutes. L'ADN génomique sera alors dilué au 1/20<sup>ème</sup> dans de l'eau qualité biologie moléculaire. Ensuite, le génotypage des souris est réalisé par PCR quantitative (qPCR) à l'aide de couples d'amorces ciblant respectivement le gène codant MGP (Forward oligonucléotide : 5'-AGA GAG TCC AGG AAC GCA AC-3' ; Reverse oligonucléotide : 5'-AAG TAG CGG TTG TAG GCA GC-3') et la cassette néomycine (Forward oligonucléotide : 5'-GCC TAC CCG TGA TAT TGC TGA-3' ; Reverse oligonucléotide : 5'-AGA AGG CGA TAG AAG GCG ATG-3'). Une fois le stade de développement post-natal requis atteint, les animaux sont anesthésiés et mis à mort par décapitation (avant

sevrage) ou asphyxie au CO<sub>2</sub> (après leur sevrage à 3 semaines de vie) pour prélèvements des éléments squelettiques des membres antérieurs et postérieurs.

Les animaux sont maintenus dans une animalerie de type A1, dite « conventionnelle » (numéro d'agrément B54-547-25) avec un taux d'humidité constant (55% ± 10%), une température contrôlée (22°C ± 2) et un cycle jour/ nuit de chacun 12 heures. Les souris sont soumises à un régime standard (Scientific Animal food and Engineering) disponible *ad libitum*. Les expérimentations sur animaux ont toutes été conduites en accord avec les recommandations ARRIVE et la directive européenne 2010/63/EU.

## 2. Modèle d'arthrose spontanée

③

Pour le modèle d'arthrose spontanée, des souris WT (*Mgp<sup>+/+</sup>*) et hétérozygotes (*Mgp<sup>+/-</sup>*) pour le gène codant MGP ont été laissées vieillir jusqu'aux stades 12, 15, 18, 20 et 24 mois de vie post-natale. Une fois le stade requis atteint, les souris sont anesthésiées et mises à mort par asphyxie au CO<sub>2</sub> afin de récupérer les membres antérieurs et postérieurs.

## 3. Coloration au Rouge Alizarin/Bleu Alcian et analyse morphométrique des squelettes murins

①

La coloration des squelettes au Rouge Alizarine/Bleu Alcian a été réalisée au stade embryonnaire (E 14.5), à la naissance (P0) ainsi qu'à 14 et 21 jours de vie post-natale (P14 et P21). Pour ce faire, les souris ont été disséquées de sorte à enlever le plus possible de chair et de viscères, puis rincées avec une solution de PBS1X. Les squelettes sont ensuite fixés dans de l'éthanol 95% pour 24 heures sous faible agitation, l'éthanol 95% est ensuite remplacé par une solution de Bleu Alcian (0,03% Bleu Alcian 8GX (Sigma) ; Ethanol 75% ; acide acétique 25%) et laissé sous agitation jusqu'à obtenir une coloration bleue des éléments cartilagineux (12 à 24 heures selon l'âge des souris). Ensuite la solution de bleu Alcian est enlevée, et les squelettes sont laissés dans de l'éthanol 95% sous faible agitation pendant environ 6 heures

avant d'être placés dans une solution d'hydroxyde de potassium (KOH) 2% jusqu'à ce que les tissus non squelettiques soient devenus transparents. Les squelettes sont ensuite contre-colorés avec une solution de Rouge Alizarin (0,003% Rouge Alizarin S (Sigma) dans une solution de KOH 1%) pendant 24 à 48 heures selon l'âge de la souris. Une fois correctement contre-colorés, les échantillons sont incubés dans une solution de KOH 1%/20% glycérol pendant 48 heures minimum, ils peuvent finalement être stockés pour une longue durée dans une solution de glycérol 50%/ éthanol 50%.

Les images des squelettes complets ont été réalisées à l'aide d'un appareil de photographie Canon 10D reflex. Les images des éléments squelettique disséqués et isolés à P21 ont été réalisées à l'aide d'un stéréo-microscope Leica M80. La longueur des éléments squelettiques a été calculée et analysée via le logiciel Photoshop CS6 (Adobe).

## 4. Préparation des sections d'os longs de souris



Afin de réaliser des sections et des marquages histologiques, les os longs (fémurs et tibias) de souris ont été fixés dans du PFA 4% (pH 7,4) pendant 24 heures. Les échantillons récupérés à des stades supérieurs à P7 subissent une étape de décalcification supplémentaire à l'aide d'une solution d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) à 10% (pH 7,4). La durée de l'étape de décalcification dépend des stades de développement auxquels les échantillons ont été prélevés. De manière générale, les échantillons prélevés entre les stades P14 et P28 nécessitent 2 à 3 semaines de décalcification. Dans le cas des échantillons issus du modèle d'arthrose spontanée, ceux-ci nécessitent 4 à 6 semaines de décalcification. Ensuite, les os longs de souris sont placés dans des cassettes histologiques, déshydratés via des bains successifs de Toluène et d'alcools de concentrations croissantes à l'aide de la machine Leica ASP300s, puis inclus dans des blocs de paraffine via l'appareil d'inclusion Tissue Tek TEC (Sakura). Finalement, ces blocs de paraffine seront coupés à l'aide d'un microtome (HistoCore MULTICUT 5, Leica) et de micro-couteaux (SEC 35, MICROM) afin de générer des sections de 5 µm d'épaisseur. Ces sections seront déposées sur des lames en verre (Superfrost plus,

Thermo scientific) permettant la réalisation de marquages histologiques classiques ainsi que des marquages immunohistochimiques et d'hybridation *in situ*.

## 5. Marquages histologiques classiques

### 5.1. Coloration Hématoxyline-Eosine-Safran (HES)

①

Pour la coloration HES, les sections d'os longs de souris sont tout d'abord déparaffinées et réhydratées à l'aide d'un bain de solution de Tissue Clear (substitut moins toxique du Xylène/Toluène ; Tissue-Tek, Sakura), de bains successifs d'alcool de concentrations décroissantes et d'un lavage à l'eau courante. Les sections sont ensuite incubées dans une solution commerciale d'Hématoxyline de Harrys (5 minutes, RAL Diagnostics), puis lavées rapidement dans de l'eau courante, de l'alcool ammoniacal (alcool 60%, 0,03% alcool ammoniacal dans eau distillée) et de l'eau distillée. Après lavage, les lames sont incubées dans une solution d'éosine (5 minutes, 1% Erythrosine 239, RAL Diagnostics, dans de l'eau distillée), rincées avec de l'eau courante avant d'être incubées dans une solution de Safran (1% Safran de Gatinais dans alcool absolu) puis déshydratées via des bains d'alcools de concentrations croissantes et de Tissue Clear. Les lames sont montées à l'aide d'un milieu de montage organique PERTEX (Histolab). Les images des colorations HES ont été obtenues à l'aide du microscope Leica DM3000 LED. L'épaisseur de la plaque de croissance, de la zone hypertrophique et la surface du SOC ont été mesurées à l'aide du logiciel Image J (National Institutes of Health, NIH). Pour ce faire, 10 mesures de l'épaisseur de la plaque de croissance et de la zone hypertrophique ont été réalisées de manière aléatoire sur plusieurs coupes, représentant différents niveaux de profondeur de la plaque de croissance. Les valeurs numériques ainsi obtenues ont ensuite été moyennées pour chaque échantillon.

### 5.2. Coloration à la Safranine O/Fast Green (SO/FG)

③

Pour la coloration SO/FG, les sections sont tout d'abord déparaffinées et réhydratées à l'aide d'un bain de solution de Tissue Clear (Tissue-Tek, Sakura), de bains successifs d'alcool de concentrations décroissantes et d'un lavage à l'eau distillée. Les sections sont ensuite incubées 5 minutes dans une solution de Fast green (0,03% Fast green FCF, Sigma, dans de l'eau distillée), puis 20 minutes dans une solution d'acide acétique 1% et lavées à l'eau distillée. Finalement, les sections sont colorées 5 minutes à l'aide d'une solution de Safranine O (0,01% Safranine O (pH 5.3), Sigma, dans de l'eau distillée) avant d'être déshydratées à l'aide de bains successifs d'alcools de concentrations croissantes et d'un bain dans une solution de Tissue Clear. Les images des colorations SO/FG ont été obtenues à l'aide du microscope Leica DM3000 LED.

### 5.3. Coloration au Bleu de Toluidine

③

Pour les colorations au Bleu de Toluidine, les sections sont réhydratées dans un bain de Tissue Clear (Tissue-Tek, Sakura) et dans des bains successifs d'alcool de concentrations décroissantes avant d'être rincées à l'eau distillée. Ensuite, les lames sont incubées 20 minutes dans une solution de Bleu de Toluidine (0,1% de Bleu de Toluidine (RAL Diagnostics), 0,1% Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> (Sodium tétraborate decahydrate, Alfa aesar) dans eau distillée). Enfin, les lames sont déshydratées dans des bains successifs d'alcools de concentrations décroissantes et un bain de Tissue Clear, puis montées avec un milieu de montage organique PERTEX (Histolab).

## 6. Immunohistochimie (IHC)

①

Préalablement aux marquages immunohistochimiques, les lames histologiques sont chauffées à 42°C pendant au moins 24 heures, afin d'augmenter l'adhérence des sections sur les lames en verre. Le premier jour des marquages immunohistologiques débute par une réhydratation des sections à l'aide d'un bain de Tissue Clear (Tissue-Tek, Sakura), de bains d'alcools de

concentrations décroissantes et de lavages à l'eau distillée. Après avoir été réhydratées, les sections sont incubées 10 minutes à l'abri de la lumière avec une solution commerciale pour bloquer l'activité des peroxydases endogènes (peroxide block, ZytoMed system). Ensuite, une étape de démasquage des antigènes est réalisée en laissant les lames incuber toute la nuit à 65°C dans une solution commerciale de tampon citrate HIER 1X PH 6.0 (ZytoMed system). Lors du second jour, la solution de tampon citrate contenant les lames est d'abord laissée refroidir à température ambiante. Ensuite vient l'étape de blocage, afin de réduire le bruit de fond lors de l'étape de révélation, pour ce faire, les sections sont recouvertes d'une solution de 2,5% Normal Horse serum pendant 30 minutes minimum (Vector Lab, ImmPRESS kit Universal antibodies (Horse anti-Mouse/Rabbit IgG)). Après l'étape de blocage, les lames sont incubées toute la nuit à 4°C en chambre humide, avec les anticorps primaires dédiés : anticorps primaire anti-Collagène de Type II de souris (SantaCruz, (M2139) : sc-52658), anticorps anti-collagène de type X de souris (Quartett, 1-CO097-05) ou anticorps anti-LC3B de souris (ABclonal, A19665) dilués au 1/200<sup>ème</sup> dans une solution adaptée (Antibody diluent, Zytomed system). Lors du dernier jour, les sections sont incubées dans une solution contenant des anticorps secondaires couplés à une peroxydase (HRP) (Température ambiante, 30 minutes minimum, Vector Lab, ImmPRESS kit Universal antibodies (Horse anti-Mouse/Rabbit IgG)). Après la fin de l'incubation avec les anticorps secondaires, l'étape de révélation du marquage est initiée en recouvrant les sections avec une solution commerciale contenant un substrat de la HRP (Vector Lab, ImmPACT VIP Substrate Kit, Peroxidase). Une lame contrôle est d'abord révélée sous microscope afin de déterminer le temps d'incubation idéal pour chaque type d'échantillons et d'anticorps primaires. Après un temps de révélation optimal, les lames sont rincées rapidement avec de l'eau distillée puis 10 minutes avec de l'eau courante et séchées 10 minutes à 40°C. Finalement, les sections sont déshydratées 5 minutes dans un bain de Tissue Clear, laissées sécher à l'air libre environ 1 heure et montées avec du milieu de montage organique PERTEX (HistoLab). Les images des marquages immunohistologiques ont été obtenues à l'aide du microscope Leica DM3000 LED.

## 7. Hybridation *in situ*

### 7.1. Préparation des sondes

①

Premièrement, les plasmides contenant la séquence à transcrire sont linéarisés à l'aide des enzymes de restrictions adéquates. Pour ce faire 10 µg d'ADN plasmidique sont incubés avec un mix contenant l'enzyme de restriction dédiée, la solution tampon 10X permettant une activité optimale de l'enzyme et de l'eau qualité biologie moléculaire pour compléter le volume. Après une incubation de 1 à 2 heures à 37°C (ou autre température d'activité optimale selon l'enzyme de restriction), les plasmides linéarisés sont purifiés à l'aide du kit PCR clean up Gel extraction (Macherey-Nagel) en suivant les recommandations d'utilisation du fabricant. Afin de vérifier que les étapes de linéarisation et de purification se sont déroulées correctement, 1 à 2 µl de la solution contenant les plasmides non linéarisés (contrôles) et linéarisés sont déposés sur gel d'agarose 1%. A la suite de cette étape de vérification, les plasmides linéarisés et purifiés peuvent être stockés à -20°C en attente d'utilisation. Ensuite les sondes antisens sont transcrites à partir d'1 µg d'ADN plasmidique linéarisé et d'un mix contenant une ARN polymérase (20 U), une solution commerciale de dNTPs (1 mM dNTPs, 3.5 mM DIG-11-UTP) qui permettra de marquer les sondes avec des nucléotides UTP comportant de la digoxigénine (DIG), une solution tampon 10X commerciale spécifique de l'ARN polymérase, 10 mM DTT (Invitrogen) et un inhibiteur des RNAses (40 U, Protector RNase inhibitor, Roche), et de l'eau qualité biologie moléculaire. Le plasmide linéarisé sera incubé avec le mix de transcription *in vitro* (37°C, 2 heures), puis de la DNase I recombinante (1U, Roche) sera ajoutée au mix et laissée agir (37°C, 15-30 minutes). La réaction sera arrêtée par l'ajout d'EDTA 0,5 M, les sondes seront précipitées en ajoutant une solution de précipitation (130 mM chlorure de lithium (LiCl), éthanol 80% dans de l'eau qualité biologie moléculaire) et en incubant le tout à -80°C pendant au moins 1 heure (il est toutefois recommandé de laisser les sondes précipiter toute la nuit). Après précipitation de la sonde, les tubes seront centrifugés plusieurs fois et lavés avec de l'éthanol 70%. Le culot ainsi obtenu sera laissé sécher puis resuspendu dans de l'eau qualité biologie moléculaire. Enfin, les sondes sont diluées au 1/2 dans une solution d'hybridation (50% formamide, 10 mM Tris (pH 7,6), 200

µg/ml Torula yeast RNA, 1X Denhardt's solution, 10% dextran sulfate, 600 mM NaCl, 0,25% SDS, 1 mM EDTA (pH 8,0)), dénaturées à 95°C et stockées à -20°C en attente d'utilisation.

## 7.2. Marquages par hybridation *in situ*

①

Préalablement aux marquages par hybridation *in situ*, les lames histologiques sont chauffées à 42°C pendant au moins 24 heures, afin d'augmenter l'adhérence des sections incluses dans la paraffine sur les lames en verre. Pour les marquages par hybridation *in situ*, lors du premier jour, les sections sont d'abord réhydratées dans des bains successifs de Toluène et d'alcools de concentrations décroissantes. Après réhydratation, les sections sont rincées dans deux bains successifs de 5 minutes dans du PBST1X (PBS1X, 0,1% Tween 20) et fixées pendant 10 minutes avec du PFA 4% frais. Les sections sont ensuite traitées 10 minutes avec de la protéinase K (Proteinase K recombinant grade PCR (Roche) à 5 µg/ml dans PBS1X) et post-fixées 5 minutes avec la même solution de PFA 4% qu'auparavant. En option, il est possible de réaliser une étape d'acétylation qui va permettre de réduire les charges positives présentes sur la lame en verre et sur les tissus afin de diminuer les hybridations aspécifiques des sondes d'acide nucléique chargées négativement. Cette étape consiste en un traitement de 15 minutes des lames avec une solution d'acétylation (0,01% triéthanolamine, 0,002% acétique anhydre dans de l'eau distillée stérile). Les sections sont laissées sécher à l'air libre pendant environ 1 heure, puis incubées toute la nuit à 65°C en chambre humide avec les sondes DIG-UTP antisens de l'ARNm de *Col2a1* ou *Col10a1* de souris qui ont été diluées au 1/50ème dans une solution d'hybridation (50% formamide, 10 mM Tris (pH 7,6), 200 µg/ml Torula yeast RNA, 1X Denhardt's solution, 10% dextran sulfate, 600 mM NaCl, 0,25% SDS, 1 mM EDTA (pH 8,0)). Lors du deuxième jour, les sections sont rapidement rincées dans une solution saline de citrate de sodium SSC5X (dilution de la solution mère SSC20X : 3M NaCl ; 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (dihydrogénophosphate de sodium) ; 0,02M EDTA dans de l'eau distillée stérile), incubées 30 minutes dans une solution SSC1X-50% formamide à 65°C, lavées 10 minutes dans une solution de TNE à 37°C (10 mM Tris 1M (pH 7,6) ; 500 mM NaCl 5M ; 1 mM EDTA dans de l'eau distillée stérile) et soumises à une étape de digestion par la RNase A (37°C, 30 minutes, RNase A (Roche) de concentration 20 µg/ml dans du TNE) pour éliminer les sondes non hybridées.

Ensuite, les sections sont de nouveau lavées au TNE (37°C, 10 minutes) et soumises à des bains successifs de solution SSC de concentrations décroissantes (65°C, 20 minutes). Après ces rinçages, les sections sont incubées 1 à 2 heures dans une solution de blocage (solution de tampon d'acide maléique 5X (MAB5X) : 500 mM d'acide maléique, 750 mM NaCl (pH 7,5-8,0) ; 0,1% tween 20 ; 20% Normal sheep serum (Sigma) dans de l'eau distillée stérile). Les sections sont alors placées à 4°C toute la nuit dans une solution contenant des anticorps anti-DIG couplés à une phosphatase alcaline (0,5% Anticorps anti-DIG AP Fab fragments (Roche) ; 2% Normal sheep serum ; 0,05% d'azide de sodium ; 0,1 % tween 20, dans du MAB 1X). Lors du dernier jour, les lames sont rincées successivement dans 4 à 5 bains de MABT1X, puis rincées dans du NTMT (100 mM NaCl, 100 mM tris (pH 9,5) ; 50 mM MgCl<sub>2</sub> ; 0,1% tween 20, dans de l'eau distillée stérile). L'étape de révélation est réalisée en incubant les sections en chambre humide et à l'abri de la lumière avec un substrat de la phosphatase alcaline (BM purple substrate precipitating (Roche)) jusqu'à obtenir un marquage optimal (la révélation peut durer jusqu'à trois jours en fonction du type d'échantillon et de la sonde utilisée). Enfin, les lames sont rincées au NTMT (5 minutes), fixées avec une solution de PFA 4% (30 minutes), déshydratées avec des bains successifs d'alcool absolu et de toluène puis montées avec du milieu de montage organique PERTEX (HistoLab).

## 8. Culture et traitement de chondrocytes articulaires murins

### 8.1. *Mise en culture des chondrocytes articulaires murins*

②

Des souris âgées de 6 jours de vie post-natale (P6) sont anesthésiées par isoflurane et mises à mort par décapitation. La dissection des souris s'effectue sous hotte. Le cartilage des têtes fémorales est récupéré à l'aide d'instruments stériles, tous les tissus connectifs sont soigneusement éliminés comme indiqué dans le protocole de référence (Gosset et al., 2008). Ensuite, les cartilages sont rincés avec une solution de PBS1X stérile, rassemblés selon leur génotype (réalisé la veille, cf. partie 1 du matériels et méthode), dans un même tube de 50 ml contenant du milieu Dulbeco's modified Eagle's medium (DMEM, 1g/ml Glucose, + L-Glutamine, + Pyruvate, Gibco) supplémenté avec 1% pénicilline/stéptomycine (P/S, Gibco) puis

placés dans un incubateur de culture cellulaire (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Pendant ce temps, la solution de digestion est préparée : de la Collagénase D (Roche) est reprise à une concentration de 3 mg/ml dans du milieu DMEM 1% P/S, puis stérilisée sous hotte à l'aide d'une seringue et d'un filtre 0,22 µm. Les cartilages issus des têtes fémorales sont alors laissés digérer dans la solution de Collagénase D pendant 45 minutes dans un incubateur (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). A la fin de ces 45 minutes, les têtes fémorales sont transvasées dans des tubes contenant de la solution de Collagénase D fraîche, puis sont de nouveau laissés digérer pendant 45 minutes en incubateur (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). La solution de collagénase D contenant les têtes fémorales est ensuite diluée à une concentration de 0,75 mg/ml avec du milieu DMEM supplémenté par 1% P/S. Après une étape d'agitation mécanique à l'aide d'une pipette de 25 ml visant à détacher les tissus mous, le cartilage est laissé digérer toute la nuit dans un incubateur (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Le lendemain, plusieurs étapes d'agitations mécaniques avec des pipettes de 25, 10, 5 et 2 ml sont réalisées pour disperser les derniers agrégats cellulaires. Les cellules en suspension dans le milieu seront centrifugées (20°C, 10 minutes, 400 g) puis resuspendues dans du milieu DMEM complémenté avec 10% de sérum de veau foetal (SVF, Thermofischer scientific) et 1% de pénicilline/streptomycine (Gibco), pour enfin être mises en culture dans des flasques T25 (Corning). Le milieu de culture (DMEM 10% SVF, 1% P/S) est changé tous les 2 à 3 jours.

## 8.2. *Passage des cellules*

②

Au bout de 7 à 10 jours de culture, les cultures primaires de chondrocytes contenues dans les flasques T25 arriveront à confluence. Le milieu de culture est alors éliminé, les cellules sont lavées avec du PBS1X avant d'ajouter 3ml de solution 0,05% trypsine-EDTA (Gibco). La trypsine est laissée agir 5 minutes dans un incubateur (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), puis les dernières cellules adhérentes sont récupérées par agitation mécanique de la flasque et reflux/aspiration de milieu à l'aide d'une pipette 10 ml. Les chondrocytes en suspension seront transvasés dans un tube 50 ml, centrifugés (20°C, 5 minutes, 300 g) et resuspendus dans du milieu DMEM 10%

SVF, 1% P/S frais. Enfin, des plaques de culture cellulaire 12 puits (Corning) seront ensemencées à  $5 \times 10^4$  cellules par puits.

### 8.3. *Traitements des chondrocytes primaires avec du FGF2, FGF18, ou BMP2 recombinant*

②

Au bout de 3-4 jours, lorsque les chondrocytes des plaques 12 puits arrivent à 70-80% de confluence, le milieu DMEM 10% SVF, 1% P/S est alors éliminé, les cellules sont lavées avec du PBS1X, puis prétraitées toute la nuit avec du milieu appauvri (1% SVF, 1% P/S). Le FGF2 recombinant en poudre (Recombinant Mouse FGF basic/FGF2/bFGF Protein, 3139-FB-025, Biotechne, R&D systems) est resuspendu dans du PBS1X stérile contenant 0,1% d'albumine de sérum bovin (BSA) à une concentration de 100  $\mu\text{g/ml}$ , le FGF18 recombinant (Recombinant Human FGF-18 Protein, CF, 8988-F18, Biotechne, R&D systems) est resuspendu dans de l'eau qualité biologie moléculaire à une concentration de 500  $\mu\text{g/ml}$  et le BMP2 recombinant (Recombinant Human/Mouse/Rat BMP-2 Protein, 355-BEC/CF, Biotechne, R&D systems) est resuspendu, dans une solution 4mM d'acide chloridrique (HCL) à une concentration de 100  $\mu\text{g/ml}$ , ceci en accord avec les recommandations des fabricants. Une fois resuspendu, ces trois composés sont dilués dans du milieu DMEM 1% SVF, 1% P/S à une concentration de 100 ng/ml et stérilisés sous hotte à l'aide d'une seringue et d'un filtre de 0,22  $\mu\text{m}$ . Après un lavage au PBS1X stérile, les plaques 12 puits de chondrocytes sont traitées au FGF2 ou FGF18 pendant un temps court de 1 heure ou un temps long de 24 heures, dans le cas des plaques de culture destinées à la réalisation de Western Blot. Les plaques destinées à la réalisation de qPCR, quant à elle, ne sont traitées que pendant 24 heures. Dans le cas du BMP2, les plaques des cellules dédiées aux expériences de Western blot sont traitées pendant une période de 45 minutes ou de 24 heures tandis que les plaques de cellules dédiées à la qPCR sont uniquement traitées pour une période de 24 heures. Enfin, les plaques de cellules sont congelées à sec à  $-80^\circ\text{C}$  en attente d'extraction d'ARN ou de protéines. Pour chacune de ces expériences, des puits contrôles non traités et traités avec la solution de resuspension des molécules (contrôle vehicle) ont été réalisés. Chacune des expériences de traitements de chondrocytes a été

réalisée au moins trois fois sur des cellules issues de portées différentes, chaque portée contenant au moins une souris WT et une souris MGP KO.

## 9. Extraction d'ARN et analyse de l'expression génique par qPCR

① ②

Les fémurs complets de souris ont d'abord été soigneusement disséqués en éliminant le plus de tissus connectifs possible à l'aide d'un grattoir à os. Une fois nettoyés, les os ont été rincés dans une solution de PBS 1X stérile, congelés rapidement dans de l'azote liquide avant d'être stockés à sec (-80°C). Lors de l'extraction d'ARN, les fémurs sont transvasés dans des tubes RNAses DNAses free (Eppendorf) contenant 1ml de Trizol (Tri Reagent, Sigma) et homogénéisés sur lit de glace par l'utilisation d'un outil de dispersion DI25 basic (IKA). Ensuite, 200 µL de chloroforme sont ajoutés dans les tubes, qui sont alors agités vigoureusement pendant 15 secondes, puis laissés reposer 3 minutes à température ambiante. Alors, les tubes sont de nouveau agités vigoureusement, centrifugés 15 minutes à 4°C et 12 000 rpm. A la fin de la centrifugation, 500 µL de phase aqueuse sont récupérés.

Pour les cultures de chondrocytes primaires, l'ARN est extrait à l'aide du tampon de lyse fourni dans le kit d'extraction NucleoSpin RNA plus (Macherey-Nagel).

Alors, les ARNs extraits à partir des fémurs et des cultures de chondrocytes primaires sont purifiés à l'aide du même kit NucleoSpin RNA plus, selon le protocole fourni par le fabricant.

Les ARNs ainsi purifiés sont ensuite dosés à l'aide d'un appareil dédié (Nanodrop one, Thermofischer Scientific).

100 ng d'ARNs purifiés sont utilisés pour être rétro-transcrits en cDNAs par le biais de la transcriptase inverse M-MLV RT (100 U, Invitrogen) et du mix adéquat (1 mM dNTPs ; tampon de transcription 1X (5 mM Tris-HCl, pH 8,3 ; 7,5 mM KCl ; 0,3 mM MgCl<sub>2</sub>), 0,2 µg d'hexaprimers aléatoires, 10 mM DTT, Invitrogen).

Finalement, les cDNAs sont amplifiés et quantifiés à l'aide de l'appareil de PCR en temps réel Quantstudio™ (Applied Biosystem), du supermix iTaq SYBR Green (Biorad) et 10 µM d'amorces spécifiques (Tableau 2). Le  $\Delta$ CT de chaque échantillon et pour chaque gène cible est calculé

par rapport à l'expression du gène de ménage codant la protéine ribosomale S29 (RPS29). Les  $\Delta\Delta$  CT sont ensuite calculés par rapport à la moyenne des  $\Delta$ CT des échantillons contrôles (fémurs de souris WT ou chondrocytes WT non traités). Le taux d'expression relatif d'un gène cible est alors calculé grâce à la formule mathématique  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

Gène cible	Séquence des amorces
<i>Adamts5</i>	Forward: CCT-GTT-CAC-CCG-AGA-GGA-TT Reverse : ATA-TGG-TCC-CAA-CGT-CTG-CC
<i>Atp8a2</i>	Forward: TGG-ACC-TGG-CGC-TCT-CAT-GC Reverse: CCG-ATG-GCC-AGG-GTG-ATG-GC
<i>Bmp2</i>	Forward: GAT-CTG-TAC-CGC-AGG-CAC-TC Reverse: GCC-GTT-TTC-CCA-CTC-ATC-TC
<i>Col2a1</i>	Forward: TGG-TAT-TCC-TGG-AGC-CAA-AG Reverse: ACC-AGT-TGC-ACC-TTG-AGG-AC
<i>Col10a1</i>	Forward: TTC-ATC-CCA-TAC-GCC-ATA-AAG Reverse: AGG-GAC-CTG-GGT-GTC-CTC
<i>Dync2li</i>	Forward: AGT-CAG-CAA-AGC-CGA-CCT-TAG-CG Reverse: TCC-AGC-AAG-GAG-GTT-CCT-CCA-CC
<i>Fgfr3</i>	Forward: GCA-TCC-TCA-CTG-TGA-CAT-CAA-C Reverse: CCT-GGC-GAG-TAC-TGC-TCA-AA
<i>Fgfr4</i>	Forward: CTC-ACG-GGC-CTT-GTG-AAT-CT Reverse: CAC-GAA-CCA-CTT-GCC-CAA-AG
<i>Gli1</i>	Forward: CGC-GCC-AAG-CAC-CAG-AAT-CG Reverse: TGT-TTG-CGG-AGC-GAG-CTG-GG
<i>Ihh</i>	Forward: GGC-GCG-CTT-AGC-AGT-GGA-GG Reverse: CTG-GGC-TCC-GGC-AGG-AAA-GC
<i>Kif22</i>	Forward: AGG-GAA-GCC-AAG-GGA-CCC-CC Reverse: GTG-CCT-CCT-GGG-CCA-ACA-CC
<i>Kif24</i>	Forward: TCG-CCA-ACA-TCT-CCC-CAA-GCC Reverse: TGG-TAG-CTG-AAG-CAC-AAC-ACT-TAA-CGC
<i>Mgp</i>	Forward: AGA-GAG-TCC-AGG-AAC-GCA-AC Reverse: GTA-GCC-GTA-GAC-CAT-GGC-G

<i>Mmp13</i>	Forward: ACT-CAA-ATG-GTC-CCA-AAC-GA Reverse: GGT-GTC-ACA-TCA-GAC-CAG-ACC
<i>Nkx3.2</i>	Forward: CAC-CCG-CCG-CCA-AGA-AAG-TG Reverse: CCA-GCC-CGG-GAG-ACA-GTA-GTA-AGG
<i>Ptch1</i>	Forward: CTG-GCA-GCC-GAG-ACA-AGC-CC Reverse: CCG-GTG-AGG-CCG-GAT-GTT-GG
<i>Runx2</i>	Forward: GGG-ACT-ATG-GCG-TCA-AAC-AG Reverse: GCT-CAC-GTC-GCT-CAT-CTT-G
<i>Rps29</i>	Forward: GGA-GTC-ACC-CAC-GGA-AGT-T Reverse : GCC-TAT-GTC-CTT-CGC-GTA-CT
<i>Smo</i>	Forward: CTG-GAC-CAA-GGC-CAC-CCT-GC Reverse: TTC-TGC-AGC-AGC-TCA-CGC-CG
<i>Vegfa</i>	Forward: TCC-TGT-GTG-CCG-CTG-ATG-CG Reverse: CTG-ACG-TGG-GCA-CGC-ACT-CC

**Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées pour les expériences de PCR quantitatives**

## 10. Extraction protéique et Western Blot

### 10.1. Extraction des protéines à partir des chondrocytes murins

②

Pour l'extraction de protéines à partir des cultures primaires de chondrocytes, les plaques 12 puits sont déposés sur de la glace, puis 300 µl de de tampon de lyse SDS-PAGE 1X (5 mM DTT) y sont ajoutés. Les cellules sont lysées par action mécanique et par reflux/aspiration à l'aide d'une pipette et d'un cône de 1 ml stérile, puis les extraits protéiques ainsi obtenus sont placés dans des tubes RNases DNases free (Eppendorf). Ensuite ces extraits sont soumis à deux étapes d'ultrasonication de 5 secondes à l'aide d'un sonicateur (Sonoplus GM70 sonicator, Bandelin electronics), dans le but de lyser l'ADN génomique. Entre chaque étape de

sonication, les échantillons sont laissés refroidir dans de la glace afin d'éviter un échauffement du milieu. Les extraits protéiques sont alors conservés à -20°C en attente d'utilisation.

## 10.2. Western blot

②

Lors du premier jour, les protéines sont dénaturées dans une plaque chauffante adaptée (95°C, 3 minutes). Une fois l'étape de dénaturation terminée, 10 µl d'extrait protéique ainsi que 5 µl d'un marqueur de taille (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards, Biorad) sont déposés dans les puits de gels pré-coulés avec un gradient de polyacrylamide 4-15% (4–15% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gels, Biorad). L'étape d'électrophorèse est réalisée à 60 V/0,05 A, jusqu'à ce que les extraits protéiques migrent hors des puits de dépôt (environ 15 minutes), puis 80V/0,05 A jusqu'à ce que le front de migration sorte du gel (environ 2 heures). Ensuite, le transfert des protéines sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) disponible dans le commerce (trans-Blot Turbo Midi PVDF Transfer Pack, Biorad) est réalisé grâce au système de transfert Trans-Blot Turbo (Biorad) avec le programme recommandé par le fabricant (Durée du transfert : 3 minutes). Après le transfert, la membrane est incubée dans une solution de blocage (5% de lait en poudre dans une solution de tampon salin Tris (TBST1X) : 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% tween 20) pendant 1 à 2 heures, afin de réduire le bruit de fond lié aux liaisons aspécifiques. A la fin du premier jour, les membranes sont incubées toute la nuit (4°C) avec des anticorps primaires anti-LC3A (LC3A (D5068) XP Rabbit mAb 4599, Cell signaling), anti-LC3B (LC3B (D11) 3868 XP Rabbit mAb 3868, Cell signaling), anti-p62/SQSTM1 (SQSTM1 monoclonal antibody (M01) clone 2C11, H00008878-M01, Abnova) dilués au 1/1000<sup>ème</sup> dans du TBST1X 5% BSA ou des anticorps primaires anti-β-actine (Anti-Actin (20-33) antibody produced in rabbit , A5060, Sigma) dilués au 1/4000<sup>ème</sup> dans du TBST1X , 5% BSA. Le lendemain, les membranes sont incubées avec les anticorps secondaires couplés à une peroxydase (HRP) anti-souris (anti-mouse HRP-linked IgG 7076, Cell signaling) ou anti-lapin (anti-rabbit HRP-linked IgG, 7074, Cell signaling) dilués au 1/2000<sup>ème</sup> dans du TBST1X, 5% BSA. Enfin, pour l'étape de révélation, les membranes sont incubées avec une solution commerciale contenant un substrat de la HRP (Clarity Max Western ECL Substrate, Biorad)

selon les recommandations d'utilisation du fabricant. La visualisation des bandes de signal correspondant aux protéines cibles et l'acquisition des images de Western blot est réalisée à partir de l'appareil ChemiDoc XRS+ (Biorad). L'intensité des bandes est calculée à l'aide du logiciel ImageLab 6.1 (Biorad) et est normalisée en fonction de l'intensité des bandes correspondant aux extraits protéiques issus de cellules de souris WT non traitées.

## 11. Analyse statistique des résultats

① ②

L'analyse statistique des résultats sur deux groupes d'échantillons a été réalisée par le biais de tests t deux échantillons non appariés. Ces tests t ont été réalisés à l'aide du logiciel Graphpad Prism 9.0.0 (Dotmatics). Toutes les expériences ont été répétées au moins trois fois. Toutes les représentations des données indiquent la valeur moyenne  $\pm$  l'écart-type avec une significativité statistique telle que  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*) or  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*).

# Résultats



# 1. Etude du phénotype squelettique des souris MGP KO

Comme indiqué dans la partie 2 de ce manuscrit, la protéine matricielle Gla est une protéine de petite taille principalement connue pour réguler le processus de minéralisation au niveau artériel, trachéobronchique et de plusieurs cartilages (cartilages auriculaires, nasaux ou de la plaque de croissance).

Le modèle murin de la déficience en MGP, les souris MGP KO, présentent ainsi 3 phénotypes majeurs : un phénotype vasculaire (létal) lié à des calcifications massives des artères, un phénotype respiratoire caractérisé par une accélération de la minéralisation des éléments cartilagineux trachéobronchiques et un phénotype squelettique qui comprend un retard de croissance, une ostéopénie et une hypoplasie médio-faciale.

De récentes études se sont intéressées au rôle de MGP dans le remodelage du tissu osseux et indiquent un rôle de cette protéine dans la régulation de l'activité des ostéoblastes et ostéoclastes.

Cependant, en ce qui concerne le rôle de la déficience en MGP dans l'apparition de nanisme modéré et les altérations de la plaque de croissance, très peu d'études ont été menées en dehors de la première description du modèle MGP KO faite il y a maintenant 25 ans.

Ainsi, cette première partie des résultats se propose de décrire, pour la toute première fois, les altérations de la plaque de croissance qui prennent place chez les souris déficientes en MGP.

En parallèle, une étude de l'impact de la déficience en MGP sur les principaux acteurs moléculaires de la plaque de croissance a été réalisée, ceci afin de mieux caractériser la place que prend MGP au sien de ce processus complexe et multiphasique qu'est le développement squelettique.

## 1.1. Description des altérations de la plaque de croissance des souris MGP KO

### 1.1.1. Article

#### ***Matrix Gla protein deficient mice develops moderate growth retardation associated with lack of hypertrophic chondrocytes***

Alexandre Marano<sup>1</sup>, Chaohua Deng<sup>1</sup>, Cedric Laurent<sup>2</sup>, Adrien Baldit<sup>2</sup>, Cécile Guillaume<sup>1</sup>, Nathalie Presle<sup>1</sup>, Arnaud Bianchi<sup>1</sup> and Hervé Kempf<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CNRS UMR 7365 IMoPA, Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France

<sup>2</sup> CNRS UMR 7239 LEM3, Université de Lorraine, Metz, France

#### **Abstract**

Matrix Gla protein is a small protein mainly expressed in cartilages and arteries. MGP belongs to the Vitamin K-dependent family (VKDPs), characterized by presence of  $\gamma$ -carboxyglutamates (Gla) residues. Those Gla residues allow MGP to directly binds calcium ions, calcium containing crystals or Bone morphogenic protein 2 (BMP2) to inhibits mineralization of soft tissue. Experimental model of MGP deficiency, MGP KO mice exhibits extensive calcification of arteries, abnormal calcification of cartilage associated with midface hypoplasia and moderate growth retardation. Studies of vascular and craniofacial phenotype have confirmed the major role of MGP as an inhibitor of calcification. In contrast, the growth retardation observed in absence of MGP appears not to be linked to abnormal calcification but remains largely understudied. In this context, herein for the very first time, we study and describe postnatal skeletal phenotype of MGP KO mice. Our morphological and histological results show a significant shortening of hypertrophic zone, as well as an alteration of secondary ossification center (SOC) formation during post-natal development in absence of MGP. Analyses of mRNA expression pattern indicate multiphasic temporal variation of several genes known to regulate growth plate maturation.

In conclusion, MGP appears to be at the crossroad of a complex molecular network that is involved in regulation of skeletal development.

## Introduction

Skeletal development is a complex process that takes place through two different mechanisms depending on the bone type. First, intramembranous ossification is the process that allows formation of bone from the rostral neurocranium, the splanchnocranium and lateral part of the clavicle. This process is characterized by direct differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) to immature osteoblasts (Gilbert et al., 2000; Percival et Richtsmeier., 2013; Beredsen et Olsen., 2014; Ornitz et Marie., 2015). Secondly, long bones from the limb and axial skeleton, as well as the rest of the cranium elements are formed through the process of endochondral ossification. In contrast to intramembranous ossification, bone formation is preceded by formation of a transient cartilage anlagen due to differentiation of MSCs into chondrocytes.

In long bones, the process of endochondral ossification takes place in the epiphysis (i.e. bone extremities) in a highly specialized cartilaginous structure termed growth plate. Within this structure, resting rounded chondrocytes that derive from MSCs are characterized by expression of transcription factor Sox9, type II collagen and proteoglycans such as aggrecan. Then, these chondrocytes will begin to proliferate and organize with a specific columnar arrangement along the longitudinal axis of the growth plate. Next, chondrocytes will undergo maturation and become pre-hypertrophic chondrocytes that are characterized by expression of transcription factors RUNX2 and OSX/SP7 as well as the Indian Hedgehog (IHH). This specific gene expression allows progression of the maturation process; thus, chondrocytes will increase their volume 10-15 times by massive water absorption and become hypertrophic. The early hypertrophic chondrocytes express specific matrix molecules such as type X Collagen and alkaline phosphatase (ALP) associated with a concomitant loss of *SOX9*, *COL2A1* and *ACAN* (aggrecan) expression. More, these chondrocytes will mature to late hypertrophic chondrocytes that express Matrix Metalloproteinase 13 (MMP13), Vascular Endothelial Growth Factor alpha (VEGF-A), aggrecanases such as ADAMTS5 and osteopontin (OPN). Sequentially, MMP13 and aggrecanases are responsible for extracellular matrix degradation, then VEGF-A angiogenic effect will induce vascular invasion of cartilage and then will provoke migration of endothelial cells, osteoclasts, and bone marrow cells. The combined actions of these cells will trigger ECM mineralization to form trabecular bone. In parallel, late

hypertrophic chondrocytes will undergo apoptosis or trans differentiation into osteoblasts (Zuscik et al., 2008; Zhou et al., 2014; Hata et al., 2017; Aghajanian et al., 2018).

The regulation of growth plate development involves a complex network of molecular actors and signaling pathways.

MGP is a 84 residues (14 kDa) protein which belong to the family of the Vitamin K dependent Proteins (VKDPs) also known as Gla proteins. It is expressed and synthesized in cartilage, respiratory system (lungs & Trachea), cardiovascular systems (arteries and heart), kidney, eyes, uterus, and tooth (Frazer & Price 1988; Luo et al., 1995; Wallin et al 1999; Cario-Toumaniantz et al 2007; Hashimoto et al., 2001; Tomarev et al., 2003). MGP is characterized by the presence of 4 or 5  $\gamma$ -carboxyglutamate (Gla) residues (position 2, (37), 41, 48 and 52) in mouse and humans respectively, as well as 3 phosphorylated serine residues (position 3,6,9). Gla residues are specific post-translational modifications produced by a dedicated  $\gamma$ -glutamyl carboxylase (GGCX) that require vitamin K as a cofactor (Schrurgers et al, 2008; Grober et al, 2014; Alonso et al., 2022). These specific residues confer a high affinity for calcium ions and calcium containing crystals, thus allowing MGP to directly inhibits mineral formation (Price et Faus., 1998; Hackeng et al., 2001). Additionally, through this Gla residues and a proline residue in position 64, MGP can interact with BMP2 and BMP4, two proteins implicated in both arterial calcification and skeletal development (Bostrom et al., 2001; Zebboudj et al., 2001; Yao et al., 2006).

The generation of MGP knock-out mice (MGP KO or *Mgp*<sup>-/-</sup>) has confirmed the role of MGP as a key regulator of mineralization. Indeed, MGP KO mice exhibits extensive vascular calcification, short stature and abnormal calcification of cartilage associated with cranial dysmorphism (Luo et al., 1997). The vascular phenotype of MGP KO mice has been largely studied (Luo et al., 1997; El-Maadawy et al., 2003; Murshed et al., 2004; Kaartinen et al., 2007; Leroux-Berger et al., 2011; Yao et al., 2011,2013; Guihard et al., 2020). However, the skeletal phenotype of MGP KO mice remain understudied. Marulanda et al. have uncovered that the midface hypoplasia exhibited by MGP KO mice is mostly due to accelerated mineralization and shortening of nasal septum cartilage (Marulanda et al., 2017).

In contrast to the crucial role of MGP in inhibition of soft tissue calcification, it has been demonstrated that MGP KO mice develop a moderate reduction of bone mineral density, i.e

osteopenia (Luo et al., 1997; Marulanda et al., 2013; Laurent et al., 2022). As an explanation to this “mineralization paradox” that take place in bone tissue, it has been shown that MGP is implicated both, in the promotion of bone formation by osteoblasts through activation of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and in the inhibition of osteoclastogenesis. (Zhang et al., 2019a; Zhang et al., 2019b). Interestingly, it was demonstrated that the prevention of the vascular phenotype is sufficient to restore a normal bone mass in mice, underlying the importance of the bone-vasculature axis (Marulanda et al., 2013). This paradox indicates that the role of MGP in skeletal development is not solely restricted to its activity as an inhibitor of calcification.

Consistently with this assessment, it has been observed that the moderate growth retardation that develop in absence of MGP precedes abnormal calcification of the growth plate (Luo et al., 1997). Moreover, it has been shown that MGP is required for proliferative and hypertrophic chondrocytes survival in a Gla residues independent manner (Yagami et al., 1999; Newman et al., 2001). However, the growth plate phenotype of MGP KO mice has poorly been described, thus, preventing a better understanding of MGP mode of action within this specific cartilaginous structure.

In this context, we performed a serial morphological, histological, and molecular analysis on the MGP KO mice at during time point during post-natal development to gain insight on the role of MGP in endochondral ossification of long bones.

Our work suggests that difference in skeletal growth between MGP KO and control mice that appear at 3 weeks of post-natal life is due to significant alteration of chondrocytes hypertrophy in both primary and secondary ossification centers.

## **Material and Methods**

### *2. Generation and colony management of MGP KO mice*

*Mgp* heterozygous mice were a kind gift from Monzur Murshed (McGill University, Montréal, Canada) (Luo et al., 1997). *Mgp*-deficient mice generation, performed by insertion of neomycin cassette in C57BL/6 background, was described previously (Luo et 1997). Originally in a mixed background, these mice were backcrossed for more than 10 generations into C57BL/6J background. The deficient (*Mgp*<sup>-/-</sup>) and control (*Mgp*<sup>+/+</sup>) mice were littermates

obtained by the breeding of heterozygous mice (*Mgp*<sup>+/-</sup>). Genotyping of these mice were performed on ear biopsies using the quantitative polymerase chain reaction (qPCR) method, with specific designed primers for both *Mgp* gene (Forward oligonucleotide: 5'-AGA GAG TCC AGG AAC GCA AC-3'; Reverse oligonucleotide: 5'-AAG TAG CGG TTG TAG GCA GC-3') and neomycin cassette (Forward oligonucleotide: 5'- GCC TAC CCG TGA TAT TGC TGA-3'; Reverse oligonucleotide: 5'-AGA AGG CGA TAG AAG GCG ATG-3'). qPCR cycles were performed with an initial denaturation step at 95°C for 20 seconds, then for each cycle a denaturation step is realized at 95°C for 1 seconds followed by an annealing and elongation step at 60°C for 20 seconds. 40 cycles are realized for each qPCR run.

All animals were maintained in a pathogen-free standard animal facility, ensuring a constant humidity (55%±10%) and temperature (22°C±2) in 12h dark-light cycle condition. They were fed *ad libitum* with standard food diet (Scientific Animal food and Engineering). The animal study was conducted in accordance with the ARRIVE guidelines and the Directive 2010/63/EU. Animal facility from IMoPA laboratory has been validated to ensure proper animal experimentation according French and European legislation (authorization number B54-547-25).

### 3. *Skeletal preparation and morphometry*

Whole-mount Alizarin Red/Alcian Blue skeletal staining were performed on the later fetal, newborn, and early post-natal skeletons of *Mgp* +/+, *Mgp* +/- and *Mgp* -/- mice, as described previously (Ovchinnikov, 2009). Briefly, the mice were carefully dissected with forceps and scissor to peel off the skin and to eviscerate the bodies, including the contents of the peritoneal and pleural cavities. Then, the skeletons were fixed in 95% ethanol for at least 24 hours. Ethanol 95% was replaced by filtered Alcian Blue solution (0.03% wt/vl Alcian Blue 8GX (A3157, Sigma) powder in 80% ethanol 95%, 20% acetic acid) for about 24 hours staining of the cartilage under gentle agitation. Next, the skeletons were washed with ethanol 95% for 6-8 h, then transferred into 2% potassium hydroxide solution until all the tissues become transparent, except for bones. Then, bone tissues were counterstained using an Alizarin Red solution (0.003% wt/vl Alizarin Red S powder (Sigma A5533) dissolved in 1% potassium hydroxide) for 12h to 48h depending on the age of the mice. The samples were placed in 1% potassium hydroxide/20% glycerol at least for 2 days. When the samples are appropriately cleared, there were placed in 100% glycerol for long term storage.

Macroscopic views of Alcian Blue/Alizarin Red stained skeletons were photographed by Canon 10D reflex camera. Independent elements, including knee, hip, and vertebra, were photographed a Leica M80 stereomicroscope. The length of skeleton elements was analyzed and calculated by Photoshop CS6 software.

#### 4. *Histology*

For histological examination, knee samples were fixed in 4% paraformaldehyde (pH 7.4) overnight. Then, they were processed with decalcification in 10% EDTA (pH 7.4), dehydrated and embedded in paraffin. Paraffin sections (5  $\mu\text{m}$ ) were deparaffinized in Tissue-Tek Tissue Clear (Sakura) and rehydrated in a graded series of ethanols. Sections were stained with Hematoxylin- Eosin- Safran (HES, RAL Diagnostics). The images were obtained with a Leica DM3000 LED microscope. The height ( $\mu\text{m}$ ) and surface ( $\mu\text{m}^2$ ) of the growth plate zone were calculated by ImageJ software. For each sample, several sections were used to perform 10 random measurements of total growth plate and hypertrophic zone heights. Then, average height values were calculated for each section and so for each sample.

#### 5. *Immunohistochemistry (IHC)*

For immunohistochemistry, paraffin embedded sections were first heated for 24 hours at 42°C. On the first day, after serial incubation in graded series of ethanol, a final rehydration step was performed in 3 subsequent baths in ddH<sub>2</sub>O of 5 minutes. Then, sections were incubated 10 minutes in a dark room with peroxide block solution (ZytoMed system), washed 3 times in PBS1X and incubated overnight at 65°C in HIER Citrate buffer 1X (pH 6.0) (ZytoMed system). On the second day, sections in citrate buffer are let cooldown to room temperature, rinsed 3 times 5 minutes in PBS1X before a 30 minutes blocking step in 2,5% Normal Horse serum (Vector Lab, ImmPRESS kit Universal antibodies). After completion of the blocking step, serum is carefully drained off and sections are incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: Mouse anti-Collagen Type II antibody (SantaCruz, (M2139): sc-52658), Mouse Anti-Collagen Type X antibody (Quartett, 1-CO097-05)) diluted at 1/200<sup>th</sup> in antibody diluent solution (Zytomed system). On the final day, after being rinsed 3 times in PBS1X, sections are incubated 30 minutes at room temperature with secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (Vector Lab, ImmPRESS kit Universal antibodies). Next, sections are rinsed 3 times 5 minutes with PBS1X, then incubated with horseradish peroxidase substrate (Vector Lab, ImmPACT VIP Substrate Kit, Peroxidase), revelation step is done under

microscope light to determine the optimal incubation time for each sample type. After optimal revelation, sections are rinsed in ddH<sub>2</sub>O, incubated 10 minutes in running tap water and air dried at 40°C for 10 minutes. Finally, sections are dehydrated 5 minutes in Tissue-Tek Tissue Clear (Sakura), let air dry at room temperature for 1 hour. mounted with PERTEX organic mounting medium (HistoLab). The images were obtained by Leica DM3000 LED system.

#### 6. *In situ hybridization*

For *in situ* hybridization, 5 µm deparaffinized sections were subjected to acid hydrolysis (0,2 N HCL, 15 minutes), proteinase K treatment (5 µg/ml in PBS, 15 minutes), postfixation (4% PFA, 5 minutes) and acetylation (0,25% acetic acid, 15 minutes). Each of these steps was followed by 2 washes with PBS for 5 minutes each. After, the last PBS washing, slides were rinsed with ddH<sub>2</sub>O and air-dried, before a 2-hours prehybridization step, at 65°C, in hybridization solution (50% formamide, 10 mM Tris (pH 7,6), 200 µg/ml Torula yeast RNA, 1X Denhardt's solution, 10% dextran sulfate, 600 mM NaCl, 0,25% SDS, 1 mM EDTA (pH 8,0)). Hybridization with digoxigenin-labeled RNA probes was performed overnight at 65°C. Post hybridization, slides were rinsed briefly in 5X SSC at 65°C, washed with 1X SSC, 50% formamide (65°C, 30 minutes) subjected to RNase A digestion to reduce nonspecific hybridization and washed at increasing stringency with SSC buffers (final wash at 55°C with 0,2X SSC). Bound probes were detected with an alkaline phosphatase conjugated anti-DIG antibody (Roche) with BM purple substrate (Roche).

#### 7. 3D reconstruction of Growth plate and Secondary ossification centers volume

The geometries of Growth plate and Secondary Ossification Centers (SOC) have been additionally assessed through 3D reconstructions of the micro-tomography (µCT) volume, as detailed in a previous work (Laurent et al., 2022). First, left and right femurs from WT and MGP mice were carefully dissected, then cleaned using a bone scraper. Thus, femurs were stored at -20°C in PBS1X sterile solution. Left femurs (n=2 per group) were thawed in saline solution at 20°C for 2 h, mounted in Pyrex thin wall tubes (Cortecnet, France) and finally scanned at 70 kVp–50mA with an isotropic resolution of 30µm (Easytom Nano, RX-solution, France). Then, PyVista was used to reconstruct the external surfaces of the whole bone, as well as GP and SOC, from a manual threshold-based segmentation of the µCT volume (Sullivan et al., 2019). The external volumes of reconstructed geometries were then computed, and GP

and SOC volumes were characterized in terms of their absolute volume and their relative volume compared to the total bone volume.

#### 8. Quantitative PCR (qPCR) analysis

Mice femurs were carefully dissected, cleaned with bone scraper in Petri dish filled with sterile PBS1X, then snap frozen in liquid nitrogen and dry stored at -80°C until needed. To perform RNA extraction, samples were placed in a RNase free tube containing 1mL of Trizol solution and homogenized using DI25 basic dispersion device (IKA). Next, 200 µL of chloroform were added, tubes were vigorously agitated for 15 seconds and incubated 3 minutes at room temperature. After, tubes were vigorously agitated again and centrifugated at 12000 rpm for 15 minutes, then 500 µL of aqueous phase were retrieved to perform a purification step. RNA purification was performed using NucleoSpin RNA plus Kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. Extracted RNA was transcribed into cDNA by Reverse transcription reaction using the M-MLV enzyme (Invitrogen) and adequate mix (dNTP, transcription buffer, random hexaprimers, DTT). cDNA was then amplified and quantified by Quantstudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystem) and the iTaq SYBR Green supermix (Biorad) according to the manufacturer's instructions. Gene expression was normalized to RPS29 expression levels and then normalized to control samples.

#### 9. Statistical analysis

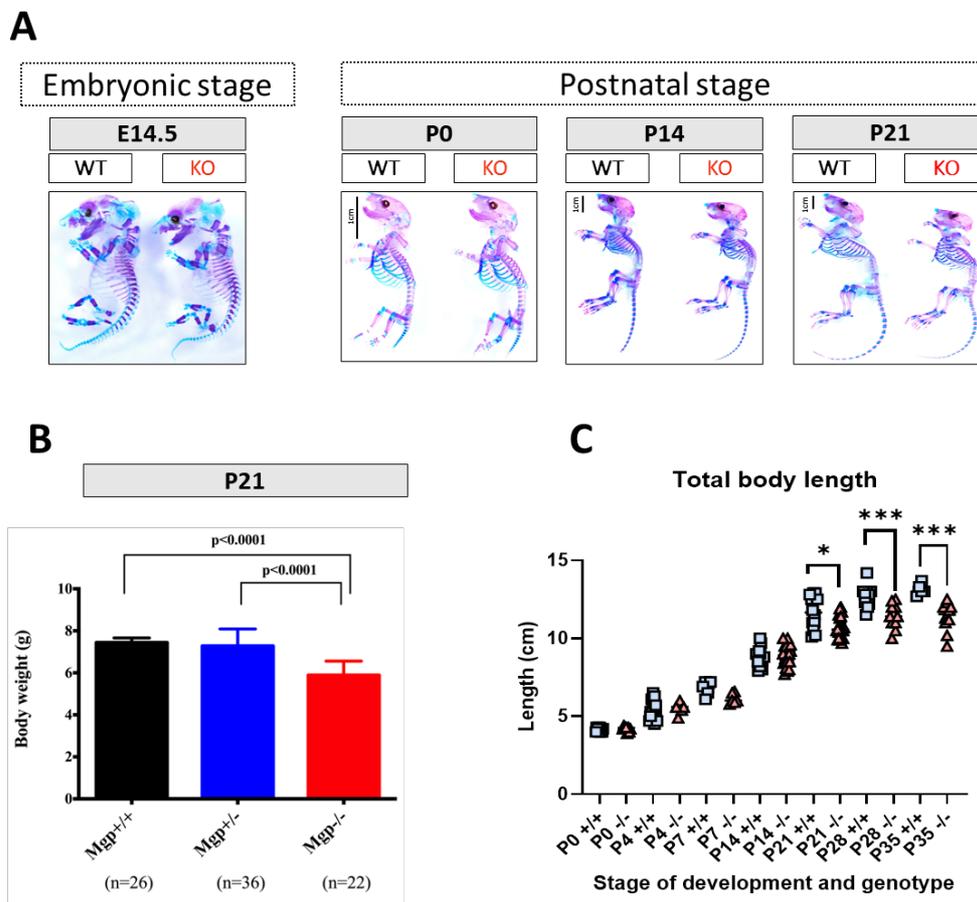
Unpaired two-tailed t-test was performed with Graphpad Prism 9.0.0 software when comparing two groups of mouse samples. All experiments were repeated at least 3 times. All data are reported as means ± SD with statistical significance defined as  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*) or  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*).

## Results

### **MGP KO mice develop moderate growth retardation during post-natal skeleton development**

The overall appearance analysis of all the mice used in this study (data not shown) confirmed the moderate growth retardation of the MGP KO mice compared to their WT littermates as originally described by Luo et al (Luo et al., 1997). In order to characterize to better

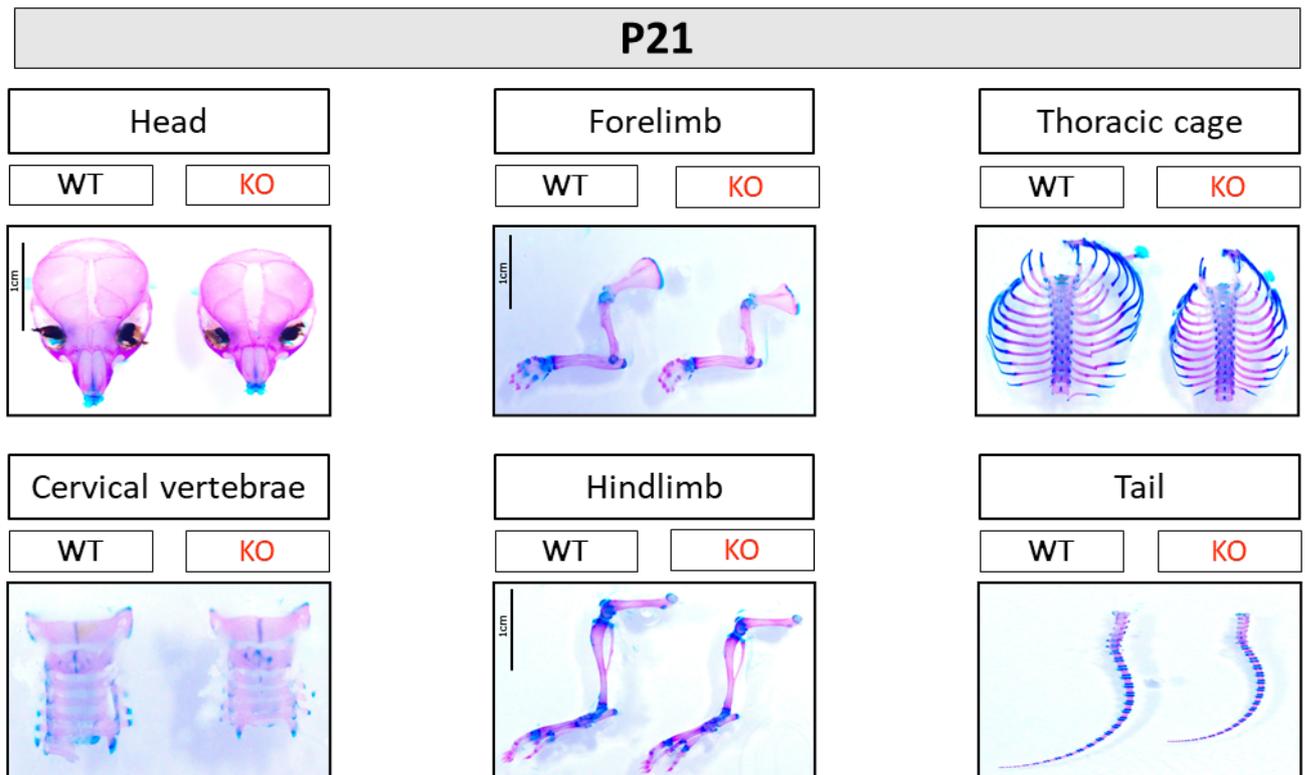
characterize effect of MGP absence on skeletal development and morphology, we first performed whole-mount Alizarin Red/Alcian Blue skeletal staining in mice staged from mid-gestation to 4 weeks after birth. No difference in the skeleton size was found from early embryonic stage (E14.5) to birth (P0) and early postnatal stages (up to P14) between all genotypes. However, still in accordance with the original description of MGP KO mice (Luo et al., 1997), although no variation could be observed between WT and heterozygous mice (data not shown), appears postnatally in MGP KO mice and became clearly visible at P21 onwards (Fig. 1A), with a slight aggravation over time (data not shown). Accordingly, the weight of the individuals echoes this growth retardation at P21 (Fig. 1B). To more precisely and qualitatively assessed those differences, we measured the total body length, which indicate MGP KO mice present a significant shorter stature at P21 and later stages (Fig. 1C).



**Figure 1: MGP KO mice exhibits growth retardation at 21 days of postnatal life (P21) onward**

A. Whole-mount Alizarin blue/Alizarin red staining of skeletal preparation from embryo (E14.5), newborn pups (P0) and post-natal individuals (P14 and P21). B. The total body weight of mice from WT, heterozygous and MGP

KO mice at P21. C. The total body length between WT and MGP KO (n= 5 at minimum, depending on the considered stage of development and genotype) from P0 to P35. Unpaired two-tailed t-test was used.



**Figure 2: Measurement and comparison of skeletal elements at P21**

A. The different skeletal elements of WT and MGP KO mice at 21 days of post-natal life were analyzed, including head, cervical vertebrae, thoracic cage, forelimb, hindlimb and tail. B. Quantitative measurement of the skeletal elements by using Image J. Values represent mean  $\pm$  SD. Unpaired two-tailed t-test was used. N=6. C. Representation of 3D reconstructed femurs of WT and MGP KO mice at P14, P21 and P28 after  $\mu$ CT acquisitions (n=2 for each stage of post-natal development).

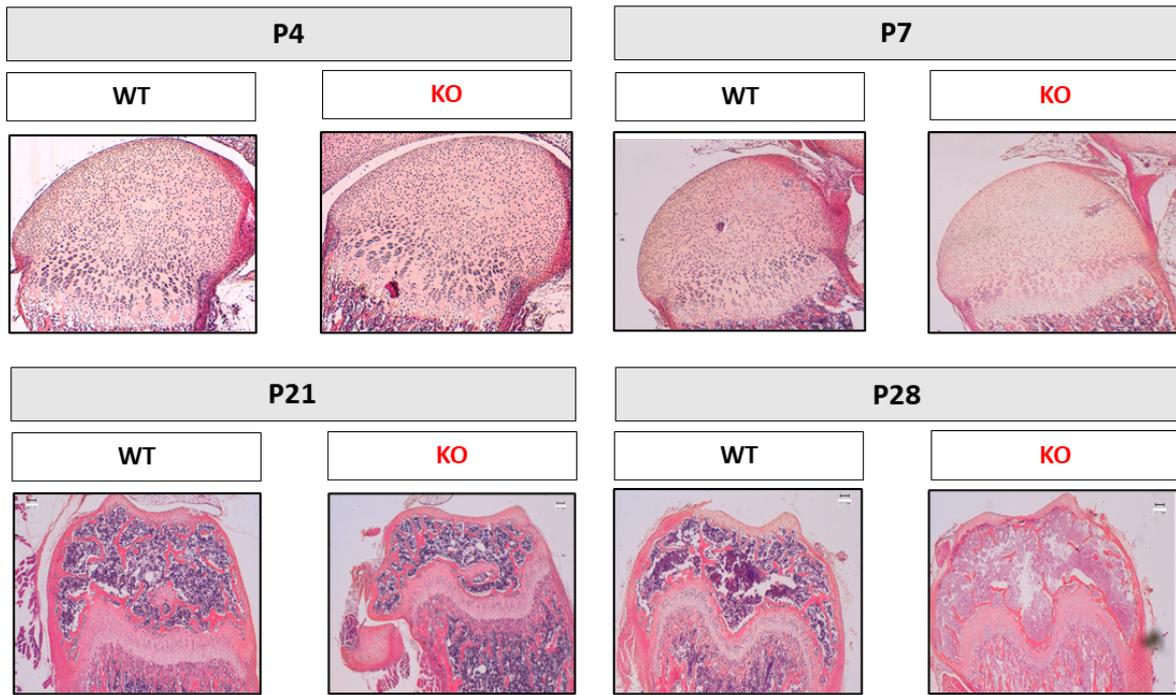
Then, we dissected each Alizarin Red/Alcian Blue stained whole skeleton into individualized skeletal elements, such as skull, vertebra, and tail. Surprisingly, all those of MGP mice KO mice were smaller than their WT littermates (Fig2A) suggesting that both endochondral and intramembranous ossification are impaired by MGP deficiency. Further measurement of each skeletal element length demonstrates the noticeable retarded skeletal phenotype at P21 (Figure 2B). These results are consistent with previous studies, in which we performed 3D reconstruction of long bones through  $\mu$ CT acquisitions that tend to confirm reduction of bone elements (Laurent et al., 2022).

## **Reduction and disorganization of growth plate cartilage in MGP KO mice**

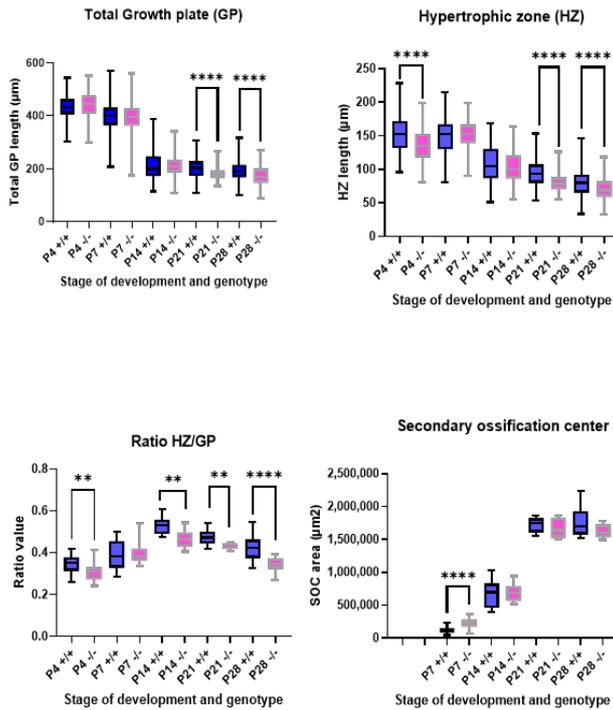
Next, we decided to investigate the effect of MGP deficiency on the epiphyseal growth plate of long bones (hindlimbs). Regarding following experiments, study of both femur and tibia lead to similar results.

First, we performed serial histological analysis at different time-points of post-natal life. Staining of WT and MGP KO mice with Hematoxylin-Eosine-Safran (HES) allowed us to observe a significant decrease in total growth plate height associated with specific reduction of the hypertrophic zone that could be observed as early as P4. On late stages of development, the shortened hypertrophic zone is still present in the growth plate of MGP KO (Figure 3 A). Interestingly, we found an alteration of secondary ossification (SOC) formation at early stage of post-natal development. Indeed, it appears that the step of SOC formation that implicate vascular invasion is more pronounced in MGP KO mice. However, it seems to be compensated in later stages as MGP KO mice does not show any significant difference compared to control mice. Measurements of growth plate elements on HES-stained sections through ImageJ software were realized to complement our observations. These measurements confirmed reduction of total growth plate and hypertrophic zone height, the ratio between these two elements is also altered in MGP KO mice (Figure 3 B). Consistently with our histological analyses and despite the limited number of samples, 3D reconstructions based on  $\mu$ CT acquisition show a decrease in both growth plate volume and height in MGP KO mice. The ratio between growth plate volume and total bone volume is also altered in absence of MGP. The alteration of growth plate tends to be more drastic as the post-natal skeletal development progress (Figure 3 C). Moreover, 3D reconstruction of SOC volume by the use of  $\mu$ CT confirm the absence of significant difference between WT and MGP KO at later stage of development (3 D).

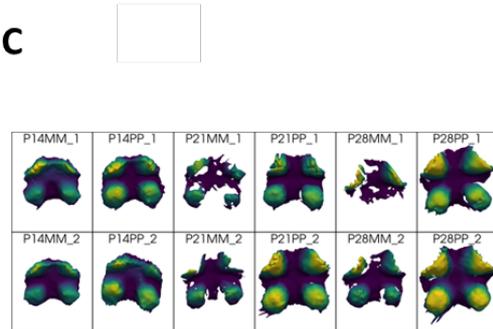
**A**



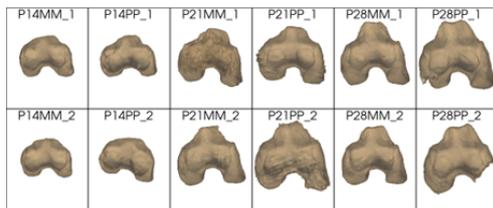
**B**



**C**



**D**



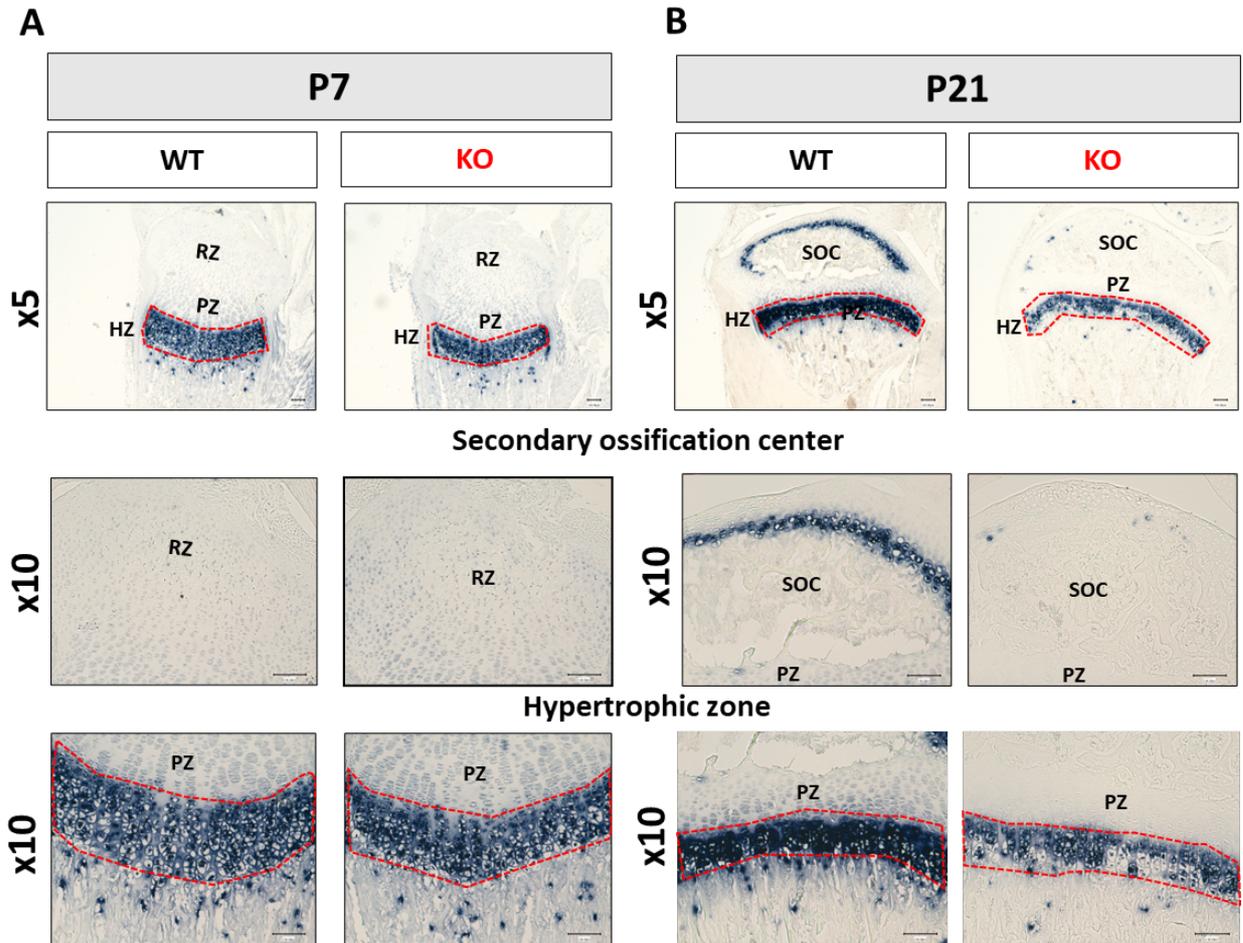
**Figure 3: MGP deficiency results in impaired growth plate structure**

*A. Hematoxylin-Eosin-Safran staining of femur sections at several time points of post-natal development: P4, P7, P14, P21 and P28. B. Quantitative measurements of growth plate zone and secondary ossification center (SOC) using Image J software. Values represent means  $\pm$  SD. Unpaired two-tailed t-test was used. N=3 for each stage.*

MGP KO present a significant reduction of total growth plate starting P21. Shortening of hypertrophic zone was observed as early as P4. A slightly however significant acceleration of SOC development is visible after 7 days of post-natal life but not in later stages. C. Growth plate volume from WT and MGP KO has been segmented from 2D  $\mu$ CT section, then computationally 3D reconstructed at age P14, P21 and P28. D. 3D reconstruction of secondary ossification centers using  $\mu$ CT. N=2 for each stage of development and genotypes. Values represent mean  $\pm$  SD. (N= 6). Unpaired two-tailed t-test was used with statistical significance defined as  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*) or  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*).

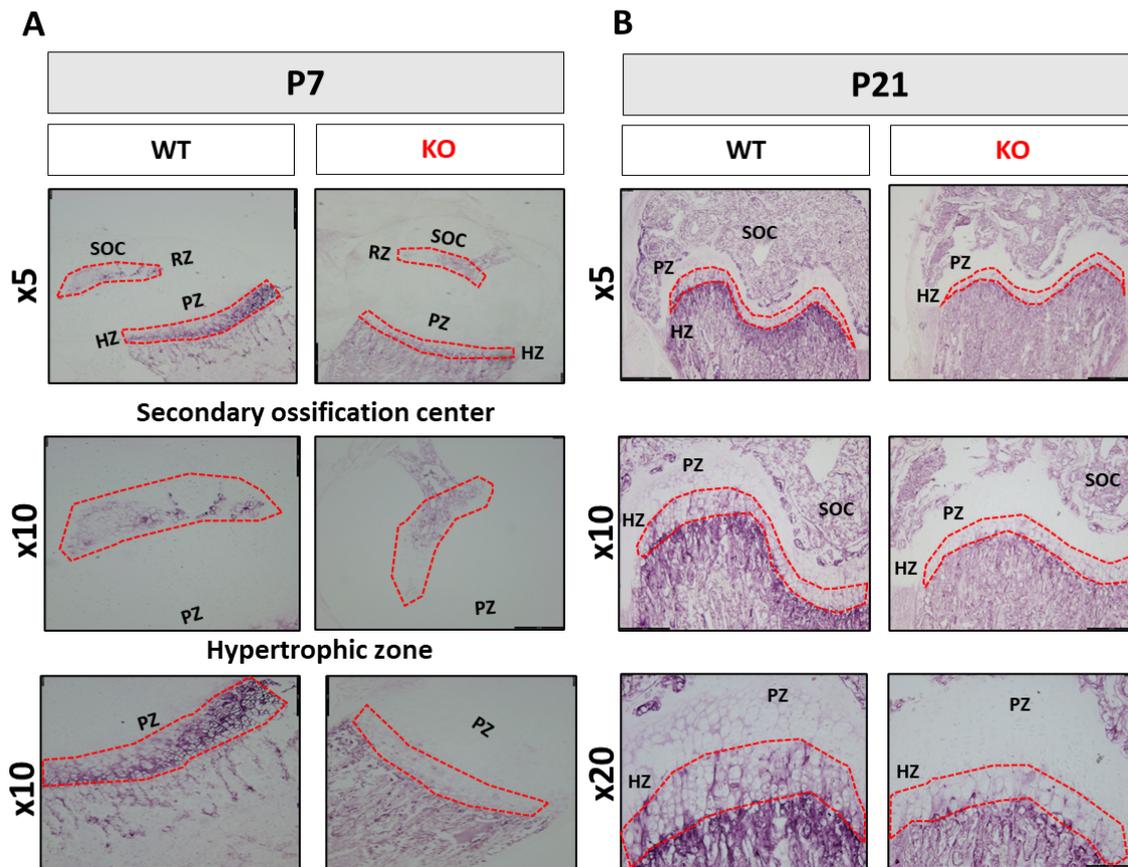
Moreover, to study growth plate phenotype of MGP KO mice, *in situ* hybridization experiments were conducted on long bone sections using *Col10a1* antisense riboprobes. A significant decrease of type X collagen expression in the hypertrophic zone was shown at 7 of postnatal life in absence of MGP (Figure 4 A). Similar experiments performed on later stage of postnatal life (P21) also show a reduction of type X collagen expression in hypertrophic zone of MGP KO mice. More, we also observed a decrease of *Col10a1* expression in the secondary ossification center of MGP deficient mice compared to WT mice (Figure 4 B).

Next, we also studied type X collagen protein level and distribution in growth plate of WT and MGP KO by immunohistochemistry experiments on long bone sections using specific antibodies. Thus, Collagen type X immunostaining confirmed the shortening of the hypertrophic zone that start at early stage (P7) in absence of MGP. Complementary to the increased SOC vascular invasion described above, a lack of hypertrophic chondrocyte in the SOC induction area of the resting zone was observed in MGP KO mice (Figure 4 A). Similarly, we also observed a decrease in *ColIX* protein level at 21 days of postnatal life in MGP KO mice compared to WT mice (Figure 4 B).



**Figure 4: Study of mRNA pattern expression of Type X collagen in growth plate of WT and MGP KO mice.**

A. In situ hybridization staining of mice growth plate sections using Col10a1 mRNA antisense probes expression at P7. B. Study of type X collagen mRNA expression in murine growth plate at P21. MGP KO mice present significant reduction of ColIX mRNA expression and lack of hypertrophy in both growth plate and SOC at P21. **HZ**: Hypertrophic zone, **PZ**: Proliferative zone, **RZ**: resting zone, **SOC**: Secondary ossification center.



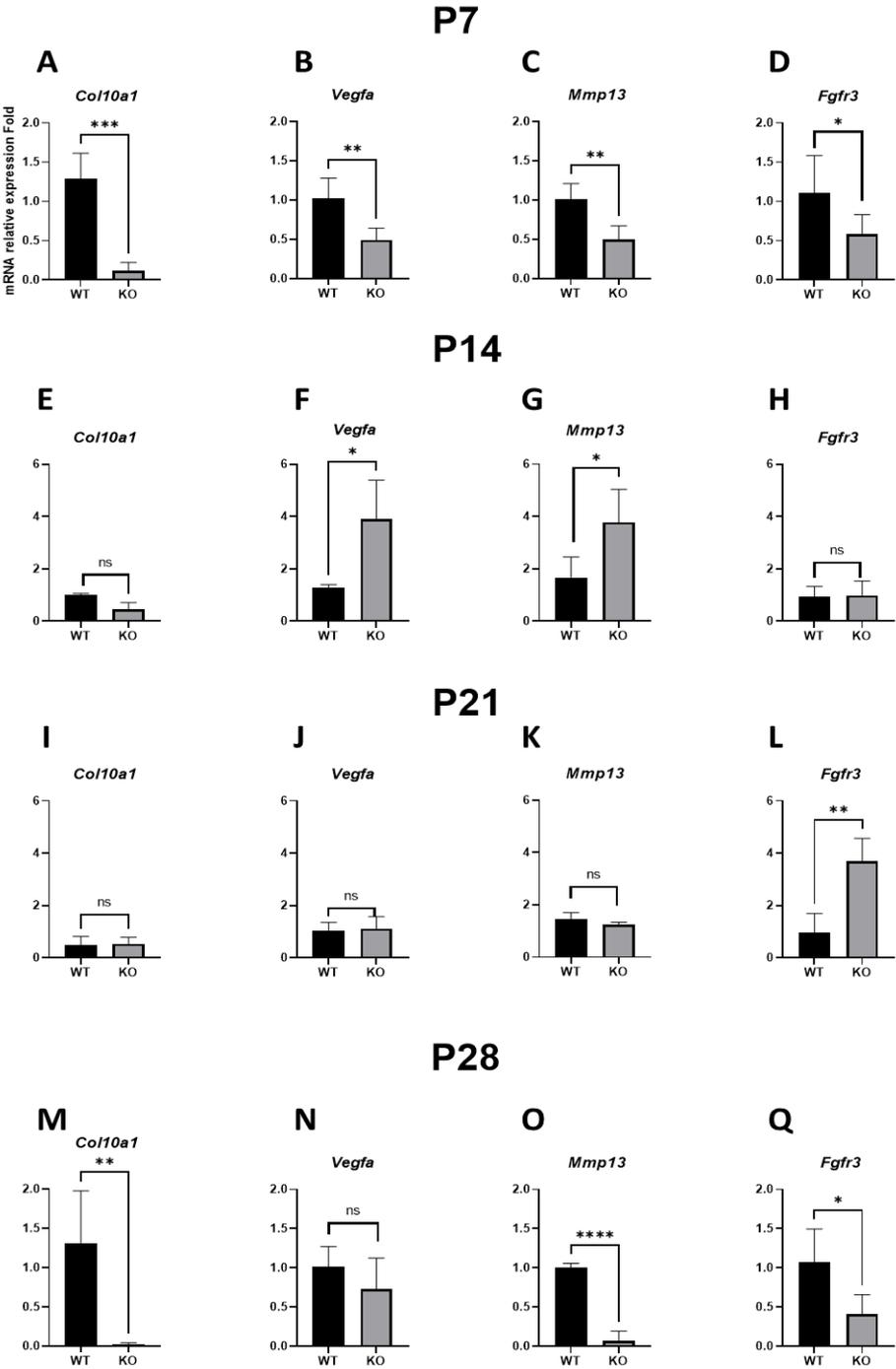
**Figure 5: Study of Type X collagen protein levels distribution in the growth plate phenotype of WT and MGP deficient mice**

A. Immunohistochemical staining of WT and MGP KO mice at post-natal stage P7 using anti-type X collagen antibodies. B. Study of Collagen type X level in mice growth plate at P21. MGP KO mice exhibits lack of hypertrophy in growth plate starting from P7. Studies of SOC formation in resting zone also reveals a lack of hypertrophy in secondary ossification center associated with a slight acceleration of resting zone vascular invasion. HZ: Hypertrophic zone, PZ: Proliferative zone, RZ: resting zone, SOC : Secondary ossification center.

### **MGP deficiency results in disturbed expression pattern of bone and cartilage genes during post-natal development**

As a final approach to study growth plate phenotype in absence of MGP, we decided to perform analyses of gene expression on cDNAs collected from WT and MGP KO mice femurs at different timepoints of post-natal development. At P7 we observed a down regulation of several pre-hypertrophic and hypertrophic chondrocytes genes including *Col10a1*, *Mmp13*, *Vegfa* and *Fgfr3* in MGP KO mice femurs (Figure 6 A-D). At the opposite, at stage P14, those chondrocytes maturation genes, are upregulated in absence of MGP (Figure 6 E-H). Surprisingly, at age P21, the post-natal

stage at which MGP KO mice exhibits significant growth retardation, only the gene expression of *Fgfr3* is modified compared to WT mice (Figure 6 I-L). At the latest stage studied, P28, almost all genes implicated in chondrocytes maturation were drastically downregulated in femurs retrieved from MGP KO mice (Figure 6 M-Q).



**Figure 6: Analysis of chondrocytes maturation gene markers expression during post-natal development**

*A-D. RNA extracted from total femur of WT and MGP KO mice at 7 days of post-natal development. MGP KO exhibits significant reduction of several pre-hypertrophic and hypertrophic gene markers expression compared to WT. E-H. qPCR experiments performed on mice femur retrieved from WT and MGP KO mice at age P14. At this stage of post-natal life, MGP KO mice present an upregulation of several gene implicated in growth plate maturation. I-L. mRNA relative expression of chondrocytes hypertrophy regulators at 21 days of post-natal life. At this stage, only FGFR3 gene is upregulated in MGP KO mice compared to WT. M-Q. Studies of chondrocytes maturation gene markers expression on RNA extracted from WT and MGP KO mice at P28. At this late stage of post-natal development, almost every gene related to chondrocytes maturation are drastically downregulated in absence of MGP. Values represent mean  $\pm$  SD. (N= 6). Unpaired two-tailed t-test was used with statistical significance defined as  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*) or  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*).*

## **Discussion**

Although MGP gene expression is detectable during embryonic development (Luo et al., 1995), MGP KO mice do not display any skeletal abnormalities during this stage of development. Vascular and skeletal phenotypes only appear during post-natal development. Extensive vascular calcification provokes early death of MGP KO mice between 6 to 8 weeks of post-natal life, due to the rupture of the large arteries and hemorrhage. Thus, MGP KO mice can only be obtained through crossbreeding of heterozygous mice. Moreover, MGP is a secreted circulating protein. Interestingly osteocalcin (aka Bone Gla protein, BGP) other members of the VKDPs have been proved to cross the placenta during pregnancy and rescue the abnormalities in BGP KO progeny (Oury et al., 2013). Altogether, these prompted us to hypothesize that MGP from pregnant heterozygous mother may pass through the placenta and compensate its absence in the MGP KO embryos.

In the growth plate, MGP is essentially expressed by proliferative and late hypertrophic chondrocytes (Luo et al., 1997). It was also demonstrated that MGP is required for the survival of proliferative and hypertrophic chondrocytes in both primary culture of chicken chondrocytes and ATDC5 cell line (Yagami et al., 1999; Newman et al., 2001). Then, the role of MGP in survival and thus maturation of growth plate chondrocyte may explain the reduction of growth plate thickness and the lack of hypertrophic chondrocytes we observed in absence of MGP. Consistently, down regulation of gene expression related to pre-hypertrophic or hypertrophic chondrocytes such as *Ihh*, *Osx*, *Col1X* or *MMP13* we observed at P7 may be related to the role of MGP in survival of chondrocytes. We can hypothesize that

the upregulation of those genes at P14 may be due to triggering of mechanisms to compensate MGP deficiency. Either way, it can also be due to alteration of one or several signaling pathways implicated in growth plate regulation.

Indeed, it has been demonstrated that MGP is implicated in the regulation of BMP2 and BMP4 signaling. Briefly, BMPs are members of the TGF $\beta$  superfamily that are implicated in arterial calcification or growth plate maturation through their capacity to induce osteogenic gene expression such as the transcriptional factor Runx2 (Halloran et al., 2020). Several studies reported that MGP can directly binds these two proteins and inhibits arterial calcification (Bostrom et al., 2001; Zebboudj et al., 2001, Yao et al., 2006). More recently, it was demonstrated, in the avian growth plate, that the proximity between MGP and BMP2 zone of expression, respectively in the late hypertrophic zone and pre-hypertrophic zone is required for proper endochondral ossification (Dan et al., 2012). Consistently to literature, we obtained preliminaries data that indicate a concomitant variation of expression regarding BMP2/BMP4 related genes and those implicated in chondrocyte maturation (data not shown). Then, the role of MGP in BMP2/BMP4 regulation may explain, at least partially the growth retardation exhibited by MGP KO mice. Interestingly BMPs are also known to be involved in a positive feedback loop with Indian Hedgehog (Ihh) pathway (Provot et al., 2005). Then, alteration of BMPs signaling may also explain the simultaneous variation of Hedgehog related genes (Ptc1, Smo, Gli1,2,3) we observed in MGP KO mice (data not shown). However, we need to go deeper into the molecular mechanisms behind MGP deficiency to confirm the role of BMPs and Indian Hedgehog.

Surprisingly, during our investigation regarding the mechanisms behind alteration of growth plate maturation, we observed an upregulation of FGFR3 coding gene among the few variations of expression detected in MGP KO mice at 21 days of post-natal life. During post-natal skeletal development, FGFR3 negatively regulate chondrocytes proliferation and maturation (Iwata et al., 2000). FGFR3 suractivation is known to induce achondroplasia (ACH), the most common form of dwarfism/skeletal dysplasia in human, with an estimated incidence between 1/15 000 and 1/25 000 birth. ACH patients develop a severe form of short stature associated with specific shortening of limbs proximal skeletal elements (i.e., femur or humerus), stenosis, midface hypoplasia, otitis, and hearing loss (Horton et al., 2007; Baujat et al., 2008; Ornitz et Legeai-Mallet., 2017). Experimental murin model that overexpress *Fgfr3* in

immature osteoblasts also exhibits reduced bone mineral density (i.e osteopenia) (Duplan et al., 2021). Interestingly, loss-of-functions mutations in Mgp gene also lead to a skeletal dysplasia in human, termed as Keutel Syndrome (Keutel et al., 1971). In a similar however alleviated manner, Keutel patients develop phenotype close to those of MGP KO mice with abnormal calcifications of their cartilage, respiratory tract, and cardio-vascular system. Clinical signs of Keutel patients are highly variable from one patient to another, it includes brachytelephalangism, abnormal calcification of cartilage associated with midface hypoplasia, short stature, hearing loss, otitis, and frequent respiratory infection (Teebi et al., 1998; Munroe et al., 1999; Hur et al., 2005; Khosroshahi et al., 2014; Perrone et al., 2018). As already discussed, MGP KO mice also develop osteopenia during post-natal skeletal development (Luo et al., 1997; Marulanda et al., 2017; Laurent et al., 2022). Then, it appears that Keutel syndrome and achondroplasia clinical signs overlap, indicating that both pathologies may somehow be related. Consistently, it has been demonstrated that experimental model of FGFR3 deficiency, FGFR3 KO mice also develop osteopenia and present an increased expression of MGP (Valverde-Franco et al., 2004). Thus, taking together literature and our preliminaries results seems to indicate a relationship between MGP and FGFR3 signaling that may partially explain the growth plate phenotype of MGP KO mice. Complementary studies are and will be undergone to better characterize the relationship between these two proteins.

The drastic reduction of almost every gene related to chondrocyte maturation at P28 may be due to the significant reduction of total growth plate thickness and hypertrophic zone at this stage of development in MGP KO mice compared to WT mice.

Thus, the growth plate phenotype observed in MGP KO mice may be the results of a complex and temporal dependent interplay between several molecular actors including BMPs signaling, Indian Hedgehog pathways or FGFR3 signalization.

Finally, MGP appears to also be implicated in secondary ossification center formation. The induction of SOC formation requires thyroid hormone T3, that will trigger hypertrophy of chondrocytes, degradation of cartilaginous matrix, vascular invasion and trans differentiation of chondrocytes to osteoblastic cells in a similar manner as for primary ossification center formation (Aghajanian et al., 2017). Vascular invasion of SOC, begins rapidly after birth, appears to implicate degradation of cartilaginous matrix by both osteoblasts and osteoclasts (Hashimoto et al., 2021). Interestingly, MGP is one of the gene that is regulated by thyroid

hormone during SOC formation, and it is implicated in mineralization and degradation of extracellular matrix by MMP9 (Gomez et al., 2022). Additionally, it has already been demonstrated that MGP appear to negatively regulate in osteoclastogenesis by modulating intracellular calcium ions flux and Src1/Ras signaling pathways (Zhang et al., 2019b). Thus, our observation that MGP deficiency seems to impact early stage of SOC development may be explained, first by its role in chondrocytes maturation in an equivalent manner that we observed in growth plate; secondly by its direct role in SOC formation as it is regulated by thyroid hormone and finally by its role in osteoclastogenesis that can affect step of vascular invasion.

As a conclusion, MGP is a small protein from the VKDPs family, that is mainly known as an inhibitor of calcification. However, in the early steps of postnatal growth plate formation, the role of MGP appear not to be related to calcification (Luo et al., 1997; Yagami et al., 1999). Indeed, moderate growth retardation exhibited by MGP KO mice starts to be noticeable at P21, thus before any abnormal calcification take place (Luo et al., 1997). Moreover, the growth plate retardation in MGP KO mice remains moderate compared to what can be observed in other mouse models including the well known and extensively studied FGFR3-mutated mice that display achondroplasia, a severe form of dwarfism.

Despite this narrowed in time and moderate in space phenotype, we were able to unveil, for the very first time, that MGP deficiency led to reduction of growth plate thickness associated with a lack of chondrocytes hypertrophy, a common feature of growth retardation models. Although our attempt to discover which mechanisms were implicated in the MGP KO phenotype likely pinpoint FGF signaling at least partially. Further work is needed to better characterize the sequence and precise pathways that we believe MGP is at the crossroad of a complex molecular network that remain to be characterized.

## **Acknowledgements**

We are thankful to Dr Monzur Murshed for providing us Mgp +/- heterozygous mice to start a colony at the IMoPA laboratory. The authors thanks interdisciplinarity grant ESCALE from the “*Université de Lorraine*” that allow us to include 3D  $\mu$ CT reconstruction data to supplement our morphological and histological analyses.

## Conflict of interest

The authors disclose no conflicts of interest.

## References

- Aghajanian, P., & Mohan, S. (2018). The art of building bone: Emerging role of chondrocyte-to-osteoblast transdifferentiation in endochondral ossification. *Bone Research*, 6(1).
- Aghajanian, P., Xing, W., Cheng, S., & Mohan, S. (2017). Epiphyseal bone formation occurs via thyroid hormone regulation of chondrocyte to osteoblast transdifferentiation. *Scientific Reports*, 7(1), 10432.
- Alonso, N., Meintzer, A., Fritz-Petrin, E., Enko, D., & Herrmann, M. (2022). Role of Vitamin K in Bone and Muscle Metabolism. *Calcified Tissue International*.
- Baujat, G., Legeai-Mallet, L., Finidori, G., Cormier-Daire, V., & Le Merrer, M. (2008). Achondroplasia. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 22(1), 3-18.
- Berendsen, A. D., & Olsen, B. R. (2015). Bone development. *Bone*, 80, 14-18.
- Biosse Duplan, M., Dambroise, E., Estibals, V., Veziere, J., Guicheux, J., & Legeai-Mallet, L. (2021). An Fgfr3-activating mutation in immature murine osteoblasts affects the appendicular and craniofacial skeleton. *Disease Models & Mechanisms*, 14(4), dmm048272.
- Boström, K., Tsao, D., Shen, S., Wang, Y., & Demer, L. L. (2001). Matrix GLA Protein Modulates Differentiation Induced by Bone Morphogenetic Protein-2 in C3H10T1/2 Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276(17), 14044-14052.
- Cario-Toumaniantz, C., Boullaran, C., Schurgers, L. J., Heymann, M.-F., Le Cunff, M., Léger, J., Loirand, G., & Pacaud, P. (2007). Identification of Differentially Expressed Genes in Human Varicose Veins : Involvement of Matrix Gla Protein in Extracellular Matrix Remodeling. *Journal of Vascular Research*, 44(6), 444-459.
- Dan, H., Simsa-Maziel, S., Reich, A., Sela-Donenfeld, D., & Monsonego-Ornan, E. (2012). The Role of Matrix Gla Protein in Ossification and Recovery of the Avian Growth Plate. *Frontiers in Endocrinology*, 3.
- El-Maadawy, S., Kaartinen, M. T., Schinke, T., Murshed, M., Karsenty, G., & McKee, M. D. (2003). Cartilage Formation and Calcification in Arteries of Mice Lacking Matrix Gla Protein. *Connective Tissue Research*, 44(1), 272-278.
- Fraser, J. D., & Price, P. A. (1988). Lung, heart, and kidney express high levels of mRNA for the vitamin K-dependent matrix Gla protein. Implications for the possible functions of matrix Gla protein and for the tissue distribution of the gamma-carboxylase. *Journal of Biological Chemistry*, 263(23), 11033-11036.
- Gilbert, L. (2000). Inhibition of Osteoblast Differentiation by Tumor Necrosis Factor-. *Endocrinology*, 141(11), 3956-3964.
- Gomez, G. A., Aghajanian, P., Pourteymoor, S., Larkin, D., & Mohan, S. (2022). Differences in pathways contributing to thyroid hormone effects on postnatal cartilage calcification versus secondary ossification center development. *eLife*, 11, e76730.
- Gröber, U., Reichrath, J., Holick, M., & Kisters, K. (2014). Vitamin K : An old vitamin in a new perspective. *Dermato-Endocrinology*, 6(1), e968490.
- Guihard, P. J., Guo, Y., Wu, X., Zhang, L., Yao, J., Jumabay, M., Yao, Y., Garfinkel, A., & Boström, K. I. (2020). Shaping Waves of Bone Morphogenetic Protein Inhibition During Vascular Growth. *Circulation Research*, 127(10), 1288-1305.
- Hackeng, T. M., Rosing, J., Spronk, H. M. H., & Vermeer, C. (2001). Total chemical synthesis of human matrix Gla protein. *Protein Science*, 10(4), 864-870.
- Halloran, D., Durbano, H. W., & Nohe, A. (2020). Bone Morphogenetic Protein-2 in Development and Bone Homeostasis. *Journal of Developmental Biology*, 8(3).
- Hashimoto, K., Hasegawa, T., Yamamoto, T., Hongo, H., Imin, Y., Abe, M., Nasoori, A., Nakanishi, K., Maruoka, H., Morimoto, Y., Kubota, K., Shimizu, T., Haraguchi, M., Takahata, M., Iwasaki, N., Li, M., Fujisawa, T., & Amizuka, N. (2021). Histological observation on the initial stage of vascular invasion into the secondary ossification of murine femoral epiphyseal cartilage. *Biomedical Research*, 42(4), 139-151.
- Hata, K., Takahata, Y., Murakami, T., & Nishimura, R. (2017). Transcriptional Network Controlling Endochondral Ossification. *Journal of Bone Metabolism*, 24(2), 75.
- Horton, W. A., Hall, J. G., & Hecht, J. T. (2007). Achondroplasia. *The Lancet*, 370(9582), 162-172.

- Hur, D. J., Raymond, G. V., Kahler, S. G., Riegert-Johnson, D. L., Cohen, B. A., & Boyadjiev, S. A. (2005). A novel MGP mutation in a consanguineous family : Review of the clinical and molecular characteristics of Keutel syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 135A(1), 36-40.
- Kaartinen, M. T., Murshed, M., Karsenty, G., & McKee, M. D. (2007). Osteopontin Upregulation and Polymerization by Transglutaminase 2 in Calcified Arteries of Matrix Gla Protein-deficient Mice. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 55(4), 375-386.
- Keutel, J., Jörgensen, G., & Gabriel, P. (2009). Ein neues autosomal-rezessiv vererbbares Syndrom. *Dtsch Med Wochenschr*, 96(43), 1676-1681.
- Khosroshahi, H. E., Sahin, S. C., Akyuz, Y., & Ede, H. (2014). Long term follow-up of four patients with Keutel syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 164(11), 2849-2856.
- Laurent, C., Marano, A., Baldit, A., Ferrari, M., Perrin, J.-C., Perroud, O., Bianchi, A., & Kempf, H. (2022). A preliminary study exploring the mechanical properties of normal and Mgp-deficient mouse femurs during early growth. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, 236(8), 1106-1117.
- Leroux-Berger, M., Queguiner, I., Maciel, T. T., Ho, A., Relaix, F., & Kempf, H. (2011). Pathologic calcification of adult vascular smooth muscle cells differs on their crest or mesodermal embryonic origin. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26(7), 1543-1553.
- Luo, G., D'Souza, R., Hogue, D., & Karsenty, G. (1995). The matrix Gla protein gene is a marker of the chondrogenesis cell lineage during mouse development. *Journal of Bone and Mineral Research*, 10(2), 325-334.
- Luo, G., Ducy, P., McKee, M. D., Pinero, G. J., Loyer, E., Behringer, R. R., & Karsenty, G. (1997). Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*, 386(6620), 78-81.
- Marulanda, J., Eimar, H., McKee, M. D., Berkvens, M., Nelea, V., Roman, H., Borrás, T., Tamimi, F., Ferron, M., & Murshed, M. (2017). Matrix Gla protein deficiency impairs nasal septum growth, causing midface hypoplasia. *Journal of Biological Chemistry*, 292(27), 11400-11412.
- Marulanda, J., Gao, C., Roman, H., Henderson, J. E., & Murshed, M. (2013). Prevention of arterial calcification corrects the low bone mass phenotype in MGP-deficient mice. *Bone*, 57(2), 499-508.
- Munroe, P. B., Olgunturk, R. O., Fryns, J.-P., Maldergem, L. V., Ziereisen, F., Yuksel, B., Gardiner, R. M., & Chung, E. (1999). Mutations in the gene encoding the human matrix Gla protein cause Keutel syndrome. *Nature Genetics*, 21(1), 142-144.
- Murshed, M., Schinke, T., McKee, M. D., & Karsenty, G. (2004). Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *The Journal of cell biology*, 165(5), 625-630.
- Newman, B., Gigout, L. I., Sudre, L., Grant, M. E., & Wallis, G. A. (2001). Coordinated expression of matrix Gla protein is required during endochondral ossification for chondrocyte survival. *Journal of Cell Biology*, 154(3), 659-666.
- Ornitz, D. M., & Marie, P. J. (2015). Fibroblast growth factor signaling in skeletal development and disease. *Genes & Development*, 29(14), 1463-1486.
- Oury, F., Khirman, L., Denny, C. A., Gardin, A., Chamouni, A., Goeden, N., Huang, Y., Lee, H., Srinivas, P., Gao, X.-B., Suyama, S., Langer, T., Mann, John. J., Horvath, T. L., Bonnin, A., & Karsenty, G. (2013). Maternal and Offspring Pools of Osteocalcin Influence Brain Development and Functions. *Cell*, 155(1), 228-241.
- Ovchinnikov, D. (2009). Alcian Blue/Alizarin Red Staining of Cartilage and Bone in Mouse. *Cold Spring Harbor protocols*, 2009, pdb.prot5170.
- Pedersen, L. B., Veland, I. R., Schrøder, J. M., & Christensen, S. T. (2008). Assembly of primary cilia. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 237(8), 1993-2006.
- Perrone, E., Chen, K., Ramos, M., Milanezi, M. F., Nakano, V., Falconi, A., Silva, J., Campos, J., Silva, C. M. C., Filho, J. B. O., & Perez, A. B. A. (2018). A Novel MGP Gene Mutation Causing Keutel Syndrome in a Brazilian Patient. *Molecular Syndromology*, 9(3), 159-163.
- Price, P. A., Faus, S. A., & Williamson, M. K. (1998). Warfarin Causes Rapid Calcification of the Elastic Lamellae in Rat Arteries and Heart Valves. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 18(9), 1400-1407.
- Provot, S., & Schipani, E. (2005). Molecular mechanisms of endochondral bone development. *Vertebrate Skeletal Biology*, 328(3), 658-665.
- Schurgers, L. J., Cranenburg, E. C. M., & Vermeer, C. (2017). Matrix Gla-protein : The calcification inhibitor in need of vitamin K. *Thromb Haemost*, 100(10), 593-603.
- Teebi, A. S., Lambert, D. M., Kaye, G. M., Al-Fifi, S., Tewfik, T. L., & Azouz, E. M. (1998). Keutel syndrome : Further characterization and review. *American Journal of Medical Genetics*, 78(2), 182-187
- Tomarev, S. I., Wistow, G., Raymond, V., Dubois, S., & Malyukova, I. (2003). Gene Expression Profile of the Human Trabecular Meshwork. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(13), 3166-3166.

- Valverde-Franco, G., Liu, H., Davidson, D., Chai, S., Valderrama-Carvajal, H., Goltzman, D., Ornitz, D. M., & Henderson, J. E. (2004). Defective bone mineralization and osteopenia in young adult *FGFR3*<sup>-/-</sup> mice. *Human Molecular Genetics*, *13*(3), 271-284.
- Wallin, R., Cain, D., & Sane, D. C. (2017). Matrix Gla Protein Synthesis and Gamma-carboxylation in the Aortic Vessel Wall and Proliferating Vascular Smooth Muscle Cells. *Thromb Haemost*, *82*(12), 1764-1767.
- Yagami, K., Suh, J.-Y., Enomoto-Iwamoto, M., Koyama, E., Abrams, W. R., Shapiro, I. M., Pacifici, M., & Iwamoto, M. (1999). Matrix Gla Protein Is a Developmental Regulator of Chondrocyte Mineralization And, When Constitutively Expressed, Blocks Endochondral and Intramembranous Ossification in the Limb. *Journal of Cell Biology*, *147*(5), 1097-1108.
- Yao, Y., Bennett, B. J., Wang, X., Rosenfeld, M. E., Giachelli, C., Lusic, A. J., & Boström, K. I. (2010). Inhibition of Bone Morphogenetic Proteins Protects Against Atherosclerosis and Vascular Calcification. *Circulation Research*, *107*(4), 485-494.
- Yao, Y., Zebboudj, A. F., Shao, E., Perez, M., & Boström, K. (2006). Regulation of Bone Morphogenetic Protein-4 by Matrix GLA Protein in Vascular Endothelial Cells Involves Activin-like Kinase Receptor 1. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(45), 33921-33930.
- Zebboudj, A. F., Imura, M., & Boström, K. (2002). Matrix GLA Protein, a Regulatory Protein for Bone Morphogenetic Protein-2. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(6), 4388-4394.
- Zhang, J., Ma, Z., Yan, K., Wang, Y., Yang, Y., & Wu, X. (2019). Matrix Gla Protein Promotes the Bone Formation by Up-Regulating Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway. *Frontiers in Endocrinology*, *10*.
- Zhang, Y., Zhao, L., Wang, N., Li, J., He, F., Li, X., & Wu, S. (2019). Unexpected Role of Matrix Gla Protein in Osteoclasts : Inhibiting Osteoclast Differentiation and Bone Resorption. *Molecular and Cellular Biology*, *39*(12), e00012-19.
- Zhou, X., von der Mark, K., Henry, S., Norton, W., Adams, H., & de Crombrughe, B. (2014). Chondrocytes Transdifferentiate into Osteoblasts in Endochondral Bone during Development, Postnatal Growth and Fracture Healing in Mice. *PLoS Genetics*, *10*(12), e1004820.
- Zuscik, M. J., Hilton, M. J., Zhang, X., Chen, D., & O'Keefe, R. J. (2008). Regulation of chondrogenesis and chondrocyte differentiation by stress. *Journal of Clinical Investigation*, *118*(2), 429-438.

### 1.1.2. Figures supplémentaires

De manière équivalente à celles concernant les sections de fémurs, des sections de tibias provenant de souris WT et MGP KO à différents stades de développement post-natal ont été colorées à l'Hématoxyline-Eosine-Safran. Des mesures des différentes zones de la plaque de croissance et des centres d'ossifications secondaires ont ensuite été réalisées à l'aide du logiciel Image J. Ainsi, nous observons une réduction de l'épaisseur de la zone hypertrophique dès 14 jours de vie post-natale mais également aux stades de développements ultérieurs. De même, ces résultats suggèrent une accélération de l'invasion vasculaire lors de la formation du SOC dans les tibias de souris MGP KO à 7 jours de vie post-natale. Une légère diminution de la surface du SOC est visible en absence de MGP au stade P14 (Figure S1 A).

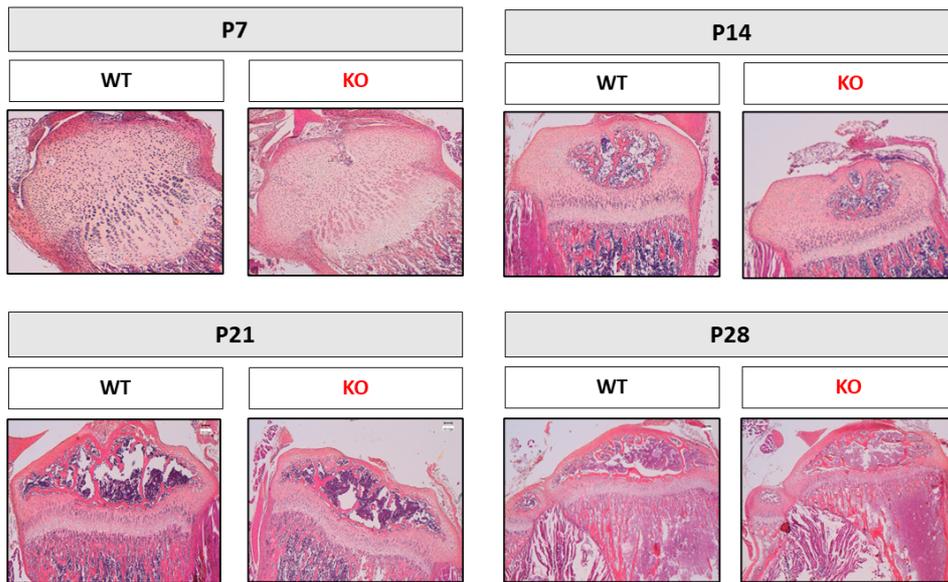
Les mesures réalisées sur ces mêmes sections confirment la réduction de l'épaisseur totale de la plaque de croissance que nous observions déjà au niveau fémoral à P21 et aux stades

ultérieurs. Ces mesures confirment également la réduction de l'épaisseur de la zone hypertrophique observable à partir du stade P14. Enfin, comme pour les sections de fémurs, le ratio épaisseur de la zone hypertrophique/ plaque de croissance totale est également altéré à partir de P14 chez les souris MGP KO (Figure S1 B).

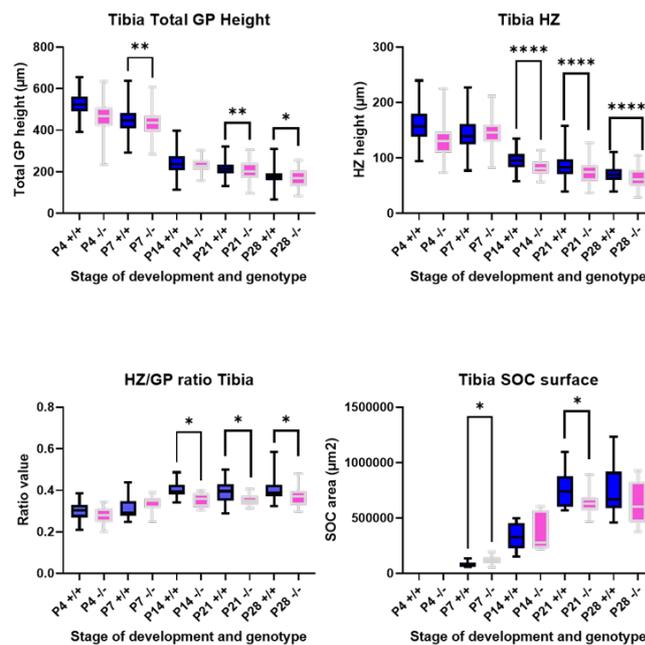
Des marquages par hybridation *in situ* avec des sondes antisens de l'ARNm de Col10a1 ont également été réalisés sur des sections de tibias au stade P4. Sur les sections de tibia issus de souris MGP KO, nous avons constaté une diminution de la zone d'expression de Col10a1 équivalente à celle observée à des stades ultérieurs (Figure S2).

En conclusion, les résultats présentés dans ces 2 figures supplémentaires confirment nos observations précédentes quant au rétrécissement de la zone hypertrophique à des stades de développement post-natal précoces, au rétrécissement de la plaque de croissance totale et à l'altération du ratio entre leur épaisseur chez les souris MGP KO.

**A**

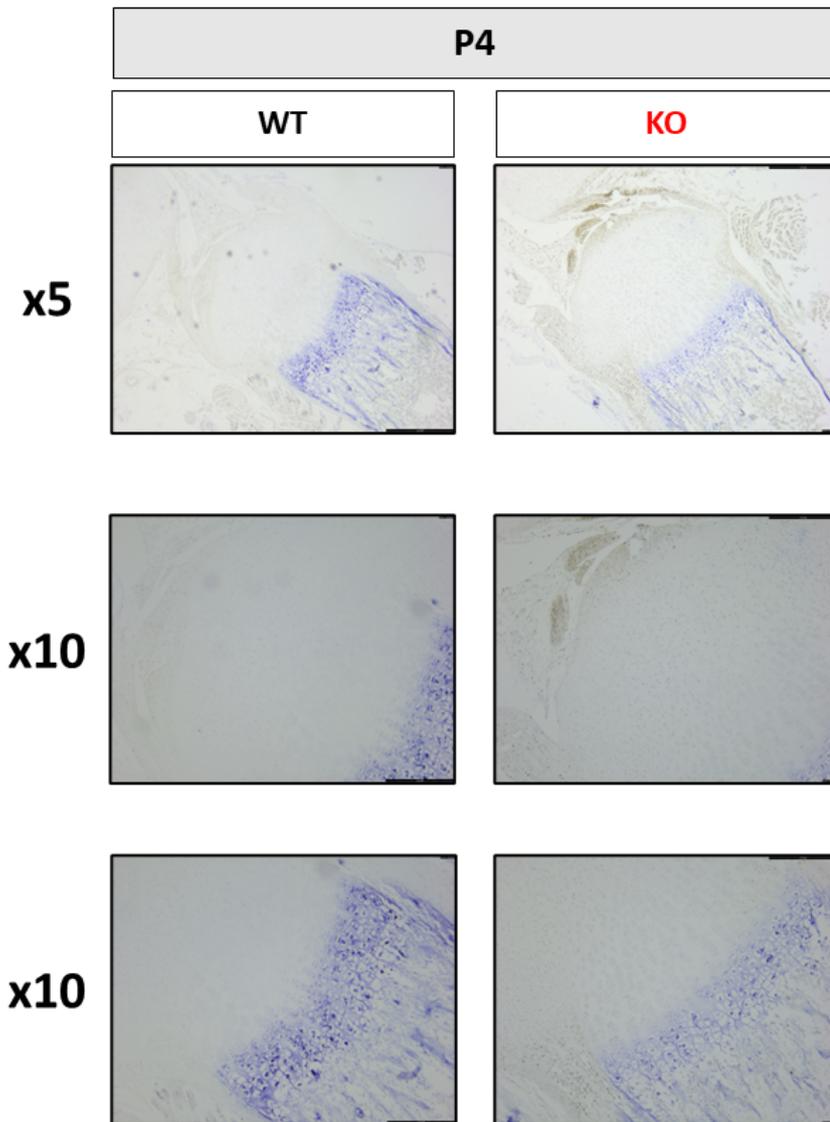


**B**



**Figure supplémentaire 1 (S1) : Analyse histo-morphométrique de l'impact de la déficience en MGP sur la plaque de croissance tibiale.**

*A. Coloration Hématoxyline-Eosine-Safran de sections de tibias à différents stades de développement post-natal : P7, P14, P21 et P28. B. Mesures quantitatives de l'épaisseur totale de la plaque de croissance, de la zone hypertrophique et de la surface totale des centres d'ossifications secondaires à l'aide du logiciel ImageJ. N=3 pour chaque stade de développement post-natal et chaque génotype. Les valeurs numériques représentent la moyenne  $\pm$  l'écart-type. Un test t non apparié à deux échantillons a été utilisé pour déterminer la significativité statistique des résultats :  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*) et  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*).*



**Figure supplémentaire 2 (S2) :** Etude de l'expression de l'ARNm de Col10a1 au sein de la plaque de croissance lors du développement post-natal

*Marquages de sections de tibia prélevés chez des souris WT et MGP KO à 4 jours de vie post-natale via hybridation in situ à l'aide de sondes antisens de l'ARNm de Col10a1. N=3 pour chaque génotype*

## 1.2. Impact de la déficience en MGP sur les acteurs moléculaires de la régulation de la plaque de croissance

Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le développement du retard de croissance chez les souris MGP KO, des expériences sur des os longs issus de ces souris ont été réalisées. Ces expériences se proposent d'étudier plusieurs acteurs moléculaires connus pour être impliqués dans la maturation des chondrocytes, notamment le processus d'autophagie, la voie des BMPs, la signalisation par FGFR3 et le cil primaire.

### 1.2.1. Marqueurs de la maturation chondrocytaire

Une analyse de l'expression des gènes impliqués dans la maturation des chondrocytes a été réalisée par la méthode PCR quantitative (qPCR) sur des ADNcs issus de fémurs complets de souris WT et MGP KO, prélevés à différents stades de développement.

Tout d'abord, nous avons observé, au stade P7, une diminution significative de l'expression de nombreux marqueurs des chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques, incluant *Col10a1* (facteur  $10 \pm 0,17$ ), *Mmp13* (d'un facteur  $2 \pm 0,11$ ), *Vegfa* (facteur  $2 \pm 0,15$ ), et *fgfr3* (facteur  $1,8 \pm 0,23$ ) dans les fémurs issus de souris MGP KO (Figure 35 A-D).

A l'inverse, au stade de développement P14, nous avons constaté une surexpression des gènes *Mmp13* (facteur  $2,7 \pm 0,73$ ), *Vegfa* (facteur  $3,25 \pm 0,9$ ) sans modifications significatives de l'expression de *Col10a1* et *fgfr3* en absence de MGP (Figure 36 A-D).

A 21 jours de vie post-natale, l'expression des gènes *Col10a1*, *Vegfa* et *Mmp13* ne présente pas de variations significatives d'expression (Figure 37 A-C).

De manière surprenante, une surexpression, d'un facteur  $3,9 \pm 0,56$ , du gène codant pour FGFR3 a également été observée chez les souris MGP KO à ce stade de développement (Figure 37 D).

Enfin, à 28 jours de vie post-natale, *Col10a1* et *Mmp13* sont fortement sous-exprimés, respectivement d'un facteur  $54 \pm 0,3$  et d'un facteur  $14 \pm 0,07$  chez les souris MGP KO par

rapport aux souris WT. Le gène codant FGFR3 est également diminué, d'un facteur  $2,5 \pm 0,23$  en cas de déficience en MGP. Le gène codant pour VEGF-A n'est quant à lui pas modifié au stade P28 (Figure 38 A-D).

### 1.2.2. La voie de signalisation Indian Hedgehog

De manière additionnelle, l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la voie Indian Hedgehog a été étudiée.

Comme dans le cas des gènes marqueurs de la maturation des chondrocytes, nous avons observé une diminution de l'expression des gènes codant pour IHH et la protéine SMO respectivement d'un facteur  $2,75 \pm 0,23$  et d'un facteur  $1,5 \pm 0,06$ . Les gènes codant pour la protéine PTCH1 et le facteur de transcription Gli1 ne connaissent cependant pas de variation significative d'expression en absence de MGP (Figure 35E-H).

De même, au stade P14, nous avons également constaté une augmentation de l'expression des gènes *Smo* (facteur  $3 \pm 0,63$ ), *Ptch1* (facteur  $3 \pm 0,36$ ) et *Gli1* (facteur  $3,3 \pm 1,4$ ) sans variation significative de l'expression du gène *Ihh*, chez les souris MGP KO (Figure 36 E-H).

A 21 jours de vie post-natale, aucun gène de la voie Indian Hedgehog ne connaît de variation significative d'expression en absence de MGP (Figure 37 E-H).

Enfin, au stade P28, comme pour la plupart des gènes étudiés, les gènes *Ptch1* et *Gli1* présentent une expression fortement diminuée, respectivement d'un facteur  $2,4 \pm 0,24$  et d'un facteur  $3,6 \pm 0,14$  chez les souris déficientes en MGP. A l'inverse, les gènes codant pour IHH et SMO ne varient pas de manière significative chez les souris MGP KO (Figure 38 E-H).

### 1.2.3. Le cil primaire

De manière connexe, du fait de l'implication du cil primaire dans la transduction de la signalisation Hedghog, nous avons également étudié l'expression de gènes liés à cette organelle.

Contrairement aux autres acteurs moléculaires impliqués dans la plaque de croissance, au stade P7, nous n'observons qu'une légère diminution du gène *Atp8a2*, d'un facteur  $1,6 \pm 0,1$ , chez les souris MGP KO, sans modifications des autres gènes liés au cil primaire que nous avons étudiés (Figure 35 I-L).

A l'inverse, au stade P14, nous observons une forte augmentation de l'ensemble des gènes liés au cil primaire étudiés, à savoir *Kif22* (facteur  $2,7 \pm 0,4$ ), *Kif24* (facteur  $22 \pm 6,5$ ), *Atp8a2* (facteur  $7,5 \pm 1,5$ ) et *Dync2li1* (facteur  $4,5 \pm 0,9$ ) en absence de MGP (Figure 36 I-L).

A 21 jours de vie post-natale, comme auparavant, nous n'observons pas de variations significatives d'expression des gènes impliqués dans la régulation du cil primaire en cas de déficience en MGP (Figure 37 I-L).

Enfin, au stade P28, comme pour le stade P7, nous n'observons une diminution significative d'expression qu'au niveau du gène codant pour ATP8A2, d'un facteur  $2,5 \pm 0,25$  chez les souris MGP KO (Figure 38 I-L).

#### 1.2.4. La voie des BMPs

Du fait du rôle de MGP dans la régulation de l'activité de BMP2, une étude de l'expression de gènes impliqués dans la voie des BMPs a été réalisée.

Au stade P7, nous observons, comme dans le cas des autres gènes, une légère diminution de l'expression de *Bmp4* (facteur  $1,6 \pm 0,1$ ), de *Bmp2* (facteur  $1,8 \pm 0,1$ ) et de l'un de ces gènes cibles *Nkx3.2* (facteur  $1,8 \pm 0,16$ ) sans modification de l'expression du gène *Runx2* (Figure 35 M-Q).

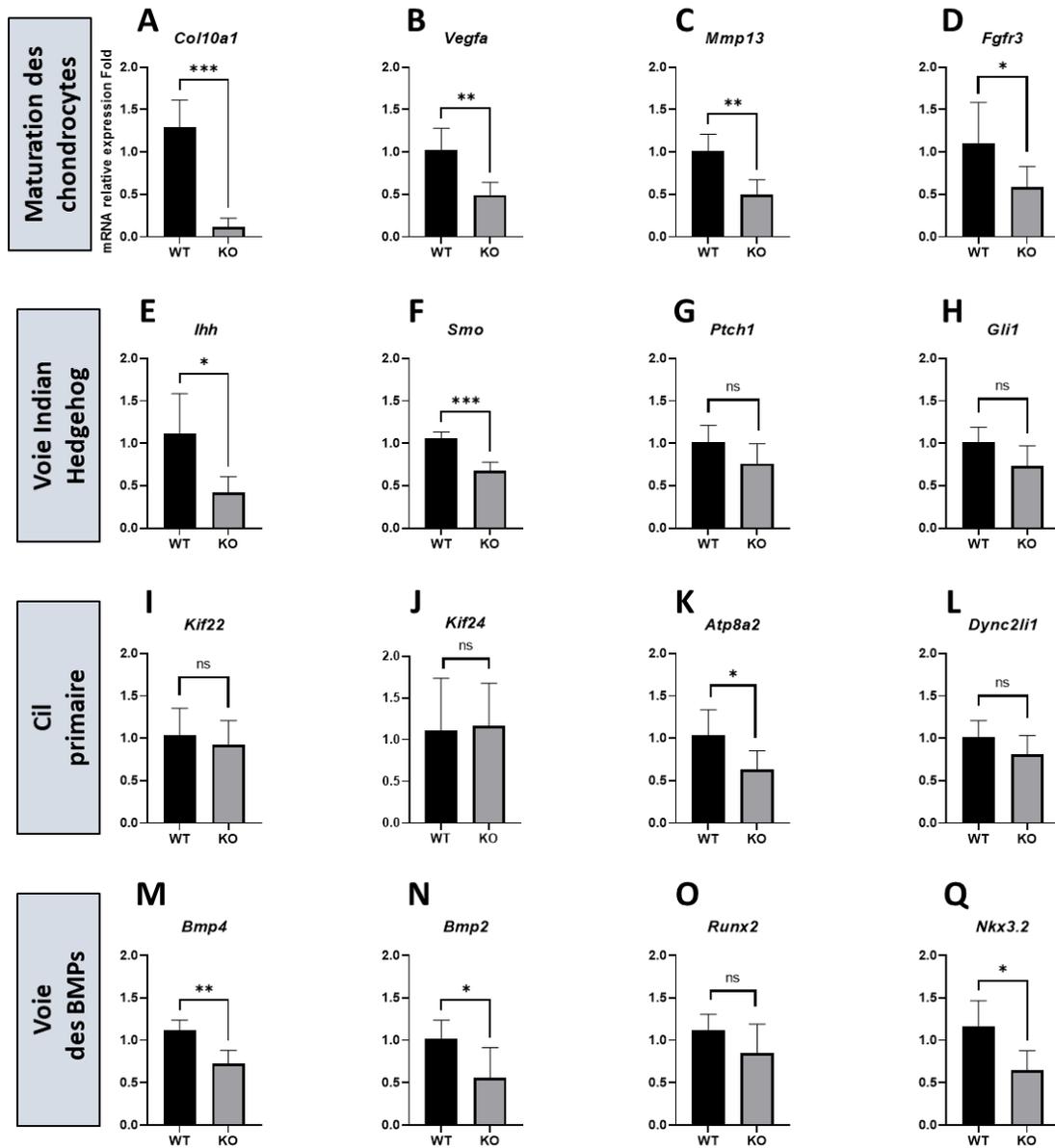
Chez les souris déficientes en MGP, à 14 jours de vie post-natale, nous constatons une surexpression des gènes codant pour BMP4 (facteur  $3 \pm 0,5$ ), BMP2 (facteur  $3 \pm 0,6$ ) et ses gènes cibles *Runx2* (facteur  $3,46 \pm 0,40$ ) et *Nkx3.2* (facteur  $6 \pm 3,3$ ) (Figure 36 M-Q).

A l'inverse de la plupart des autres gènes étudiés, l'expression de certains gènes de la voie des BMPs est modifiée 21 jours de vie post-natale. En effet, à ce stade du développement post-natal, nous observons une surexpression de *Bmp2* (facteur  $2,5 \pm 0,47$ ) et de *Nkx3.2* (facteur

1.7 ± 0.35) en cas de déficience en MGP. Les gènes codant pour BMP4 et RUNX2 ne sont quant à eux pas modifiés de façon significative (Figure 37 M-Q).

Enfin au stade P28, nous avons montré une diminution significative de l'expression de *Bmp4* (facteur 2,7 ± 0,24), *Runx2* (facteur 2,5 ± 0,25) et *Nkx3.2* (facteur 4,5 ± 0,20) mais pas du gène codant BMP2, en cas de déficience en MGP (Figure 38 M-Q).

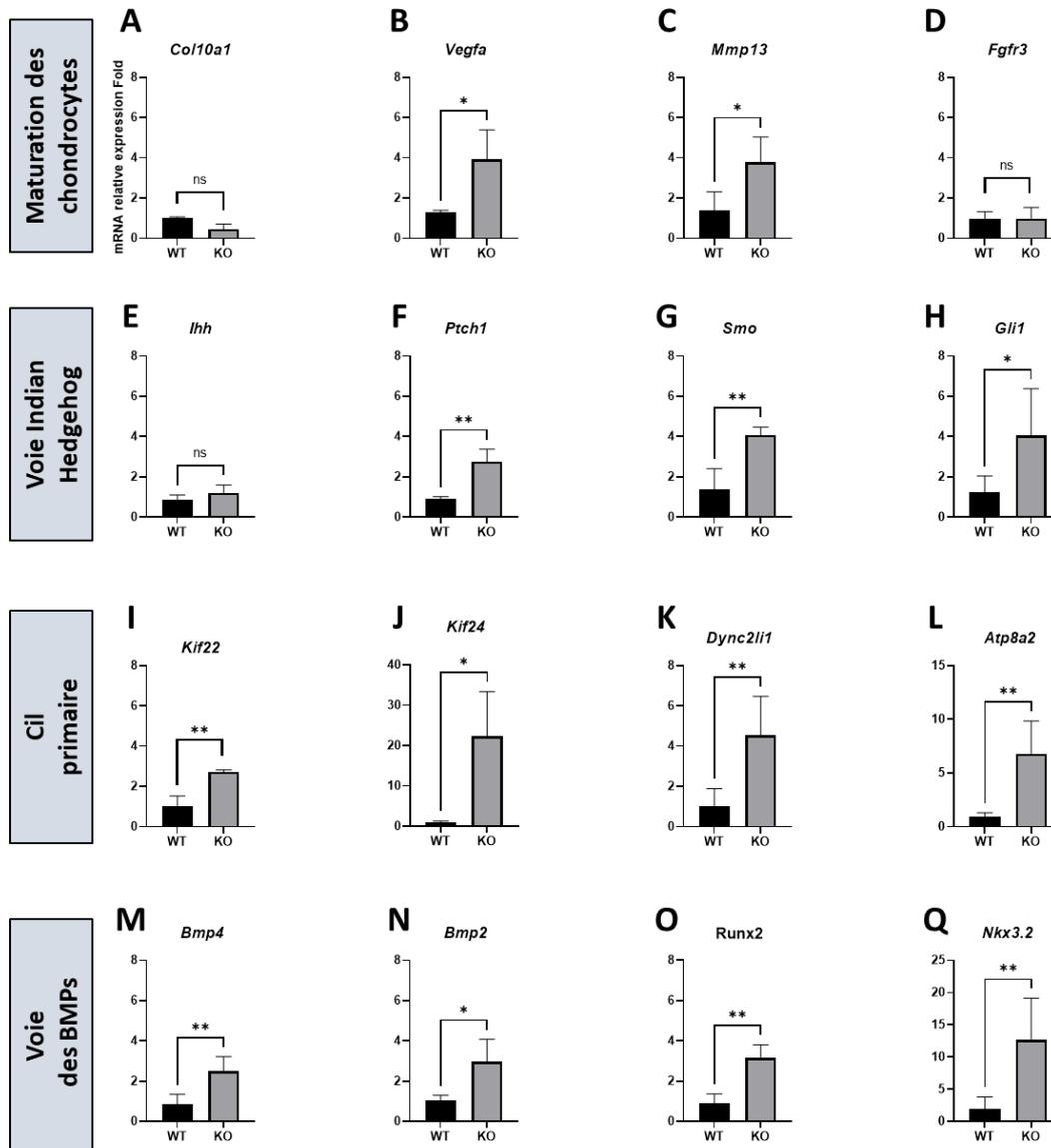
## P7



**FIGURE 35 : ANALYSE DE L'EXPRESSION RELATIVE D'ARNM DE GENES IMPLIQUES DANS LA MATURATION DE LA PLAQUE DE CROISSANCE A 7 JOURS DE VIE POST-NATALE.**

A-D. Expression relative des gènes de la pré-hypertrophie et de l'hypertrophie *Col10a1*, *Vegfa*, *Mmp13* et *Fgfr3*, dans des fémurs de souris WT et MGP. E-H. Expression relative des gènes de la voie Indian HedgeHog (*Ihh*, *Smo*, *Ptch1* et *Gli1*) dans les échantillons de fémurs complets issus de souris WT et KO. I-J. Expression relative des gènes liés au cil primaire (*Kif22*, *Kif24*, *Atp8a2* et *Dync2li1*). M-Q. Expression relative des gènes BMP4, BMP2, *Runx2* et *Nkx3.2*. N=6 pour chaque génotype. Les valeurs numériques représentent la moyenne  $\pm$  l'écart-type. Un test t non apparié à deux échantillons a été utilisé pour déterminer la significativité statistique des résultats :  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*) et  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*).

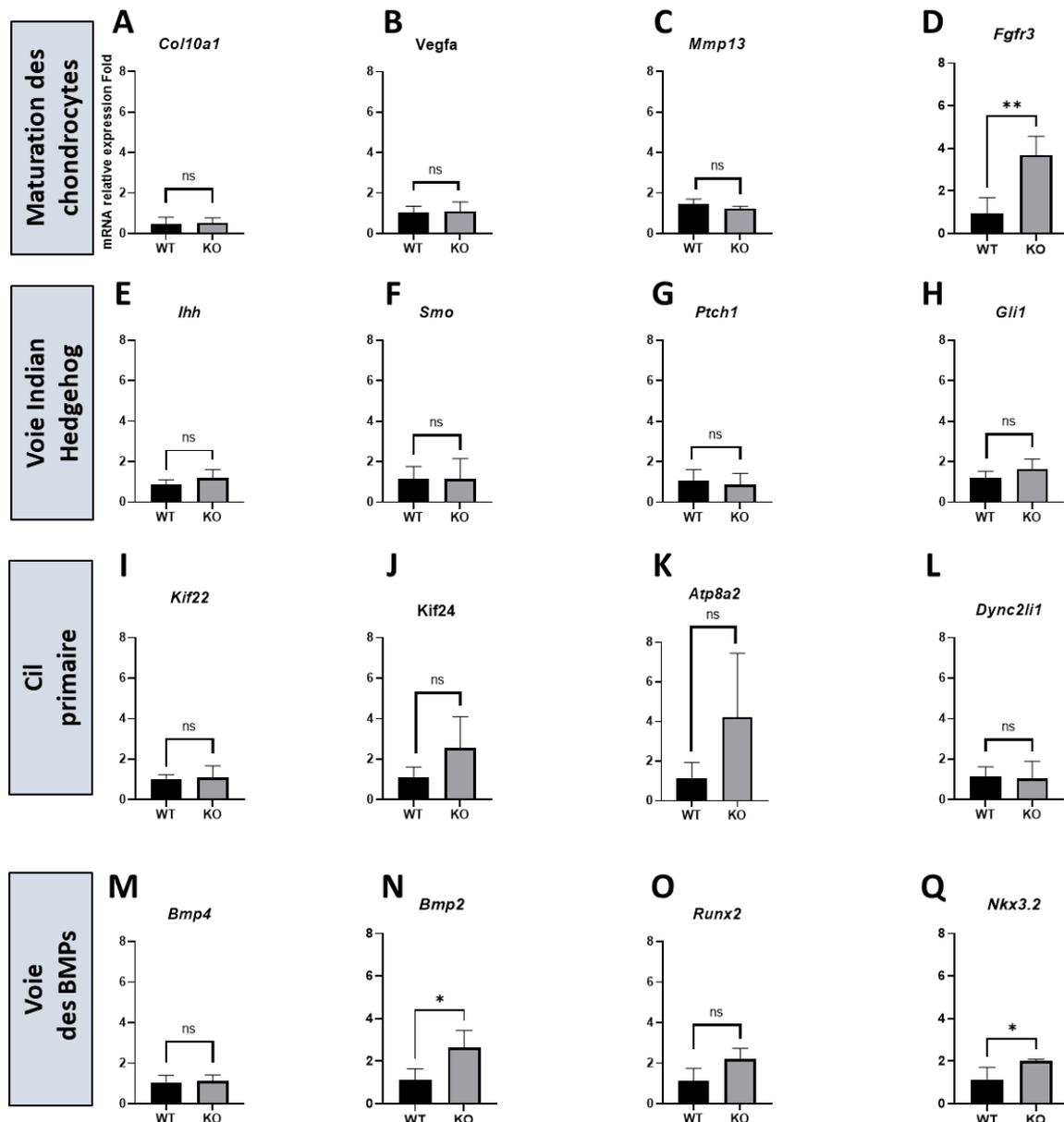
## P14



**FIGURE 36 : ANALYSE DE L'EXPRESSION RELATIVE D'ARNM DE GENES IMPLIQUES DANS LA MATURATION DE LA PLAQUE DE CROISSANCE A 14 JOURS DE VIE POST-NATALE.**

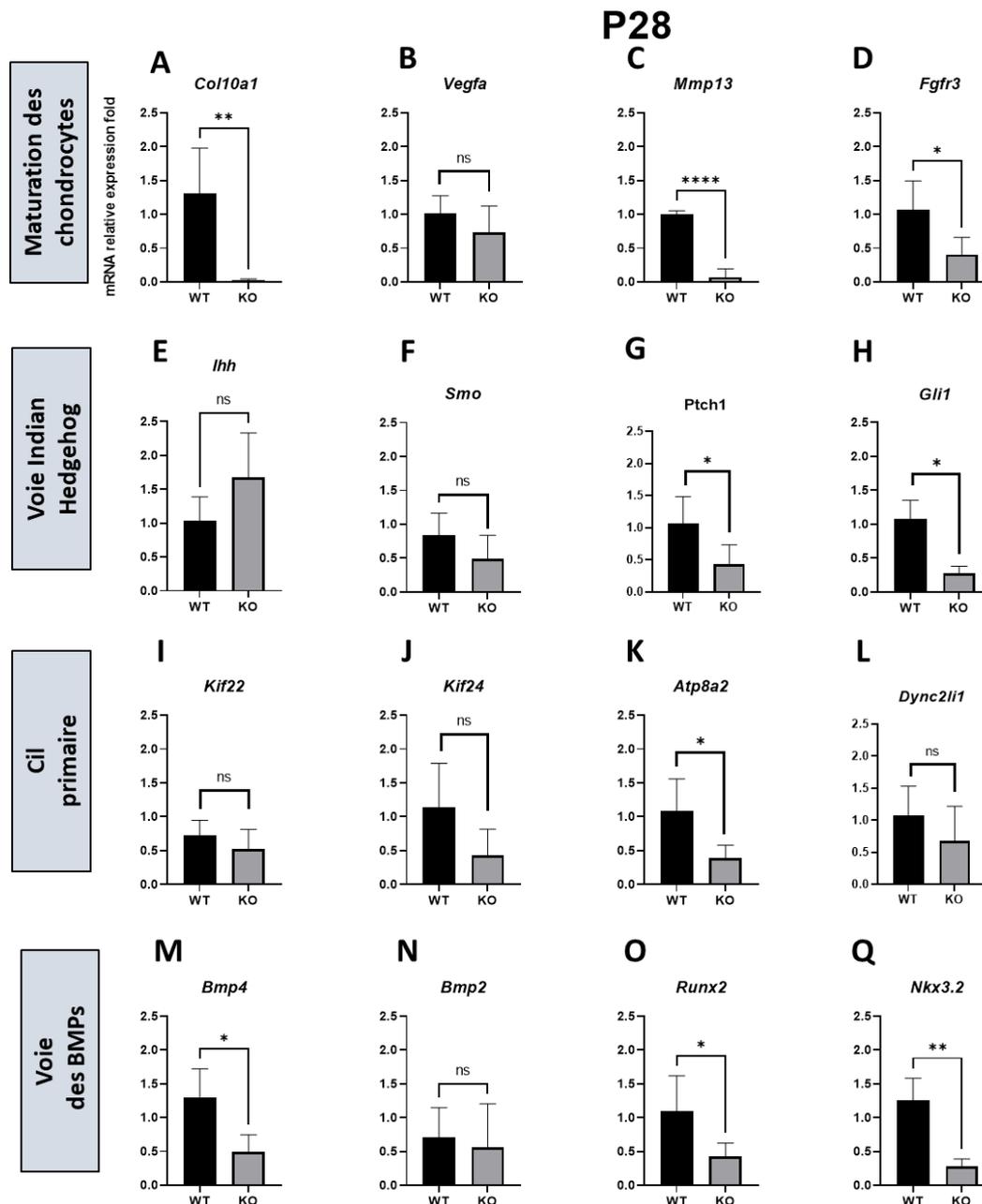
A-D. Expression relative des gènes de la pré-hypertrophie et de l'hypertrophie *Col10a1*, *Vegfa*, *Mmp13* et *Fgfr3* dans des fémurs de souris WT et MGP KO. E-H. Expression relative des gènes de la voie Indian HedgeHog (*Ihh*, *Smo*, *Ptch1* et *Gli1*) dans les échantillons de fémurs complets issus de souris WT et KO. I-J. Expression relative des gènes liés au cil primaire (*Kif22*, *Kif24*, *Atp8a* et *Dync2li1*). M-Q. Expression relative des gènes BMP4, BMP2, *Runx2* et *Nkx3.2*. N=6 pour chaque génotype. Les valeurs numériques représentent la moyenne  $\pm$  l'écart-type. Un test t non apparié à deux échantillons a été utilisé pour déterminer la significativité statistique des résultats :  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*) et  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*).

## P21



**FIGURE 37 : ANALYSE DE L'EXPRESSION RELATIVE D'ARNM DE GENES IMPLIQUES DANS LA MATURATION DE LA PLAQUE DE CROISSANCE A 21 JOURS DE VIE POST-NATALE.**

A-D. Expression relative des gènes de la pré-hypertrophie et de l'hypertrophie *Col10a1*, *Vegfa*, *Mmp13* et *Fgfr3* dans des fémurs de souris WT et MGP KO. E-H. Expression relative des gènes de la voie Indian HedgeHog (*lhh*, *Smo*, *Ptch1* et *Gli1*) dans les échantillons de fémurs complets issus de souris WT et KO. I-J. Expression relative des gènes liés au cil primaire (*Kif22*, *Kif24*, *Atp8a* et *Dync2li1*). M-Q. Expression relative des gènes BMP4, BMP2, *Runx2* et *Nkx3.2*. N=6 pour chaque génotype. Les valeurs numériques représentent la moyenne ± l'écart-type. Un test t non apparié à deux échantillons a été utilisé pour déterminer la significativité statistique des résultats :  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*) et  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*).



**FIGURE 38 : ANALYSE DE L'EXPRESSION RELATIVE DE ARNM DE GENES IMPLIQUES DANS LA MATURATION DE LA PLAQUE DE CROISSANCE A 28 JOURS DE VIE POST-NATALE.**

A-D. Expression relative des gènes de la pré-hypertrophie et de l'hypertrophie *Col10a1*, *Vegfa*, *Mmp13* et *Fgfr3* dans des fémurs de souris WT et MGP KO. E-H. Expression relative des gènes de la voie Indian HedgeHog (*Ihh*, *Smo*, *Ptch1* et *Gli1*) dans les échantillons de fémurs complets issus de souris WT et KO. I-J. Expression relative des gènes liés au cil primaire (*Kif22*, *Kif24*, *Atp8a* et *Dync2li1*). M-Q. Expression relative des gènes BMP4, BMP2, *Runx2* et *Nkx3.2*. N=6 pour chaque génotype. Les valeurs numériques représentent la moyenne  $\pm$  l'écart-type. Un test t non apparié à deux échantillons a été utilisé pour déterminer la significativité statistique des résultats :  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*) et  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*).

### 1.2.5. L'autophagie

Des marquages immunohistochimiques avec des anticorps anti-LC3B ont été réalisés sur des sections de fémurs de souris WT et MGP KO afin d'étudier le processus d'autophagie.

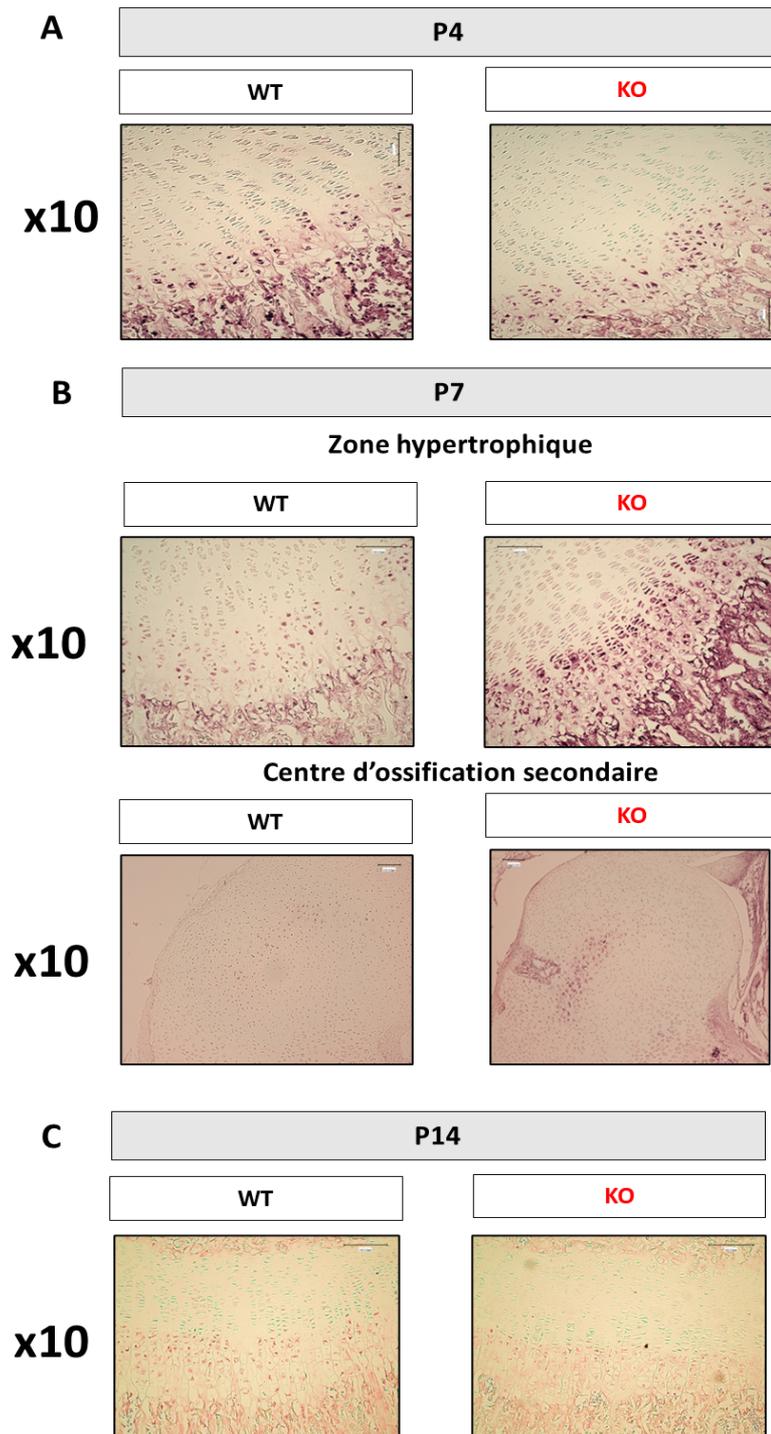
Sur l'ensemble des stades de développement post-natal étudiés, à savoir P4, P7 et P14, le marquage LC3B est présent uniquement au niveau des chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques (Figure 39).

A 4 jours de vie post-natale, aucune différence significative dans les niveaux protéiques de LC3B n'est observable entre souris WT et souris MGP KO (Figure 39 A).

A l'inverse, après une semaine de vie post-natale (P7), les chondrocytes de la zone hypertrophique des souris MGP KO sont significativement plus marqués que ceux des souris contrôles. De même, les chondrocytes hypertrophiques au niveau de la zone de formation du SOC présentent un marquage LC3B plus important chez les souris MGP KO. De plus, il est intéressant de noter que ces marquages tendent à confirmer nos observations précédentes concernant la formation du SOC en absence de MGP, à savoir une étape d'invasion vasculaire accélérée chez les souris MGP KO que chez les souris WT à 7 jours de vie post-natale (P7) (Figure 39 B).

Enfin, au stade P14, les souris MGP KO ne présentent pas de variations significatives dans l'intensité des marquages LC3B par rapport aux souris WT (Figure 39 C).

## IHC LC3B



**FIGURE 39 : ETUDE DE L'IMPACT DE LA DEFICIENCE EN MGP SUR LE PROCESSUS D'AUTOPHAGIE AU SEIN DE LA PLAQUE DE CROISSANCE PAR IMMUNOHISTOCHEMIE**

A. Marquage de la plaque de croissance de fémurs issus de souris WT et MGP KO avec des anticorps anti-LC3B au stade P4. B. Marquages immunohistologiques anti-LC3B sur de la plaque de croissance et de la zone de formation du SOC à 7 jours de vie post-natale. C. Marquage anti-LC3B de la plaque de croissance fémorale au stade P14. N= 3 pour chaque stade et génotype.

## 1.3. Discussion

### 1.3.1. Rôle de MGP au sein de la plaque de croissance

Dans la plaque de croissance, MGP est principalement exprimée au niveau des chondrocytes prolifératifs et hypertrophiques terminaux (Luo et al., 1997). Par des expériences *in vitro*, sur des cellules ATDC5 ou des cultures primaires de chondrocytes déficients ou surexprimant MGP, il a également été montré que cette protéine est impliquée dans la survie des chondrocytes prolifératifs et hypertrophiques (Yagami et al., 1999 ; Newman et al., 2001). Ainsi, le rôle que MGP tient dans la survie des chondrocytes pourrait expliquer la réduction de l'épaisseur de la plaque de croissance observée et plus particulièrement le raccourcissement de la zone hypertrophique observé dès 4 jours de vie post-natale. Cette fonction de MGP dans la survie cellulaire pourrait également expliquer la diminution du marquage immunohistochimique avec les anticorps anti-CollX visible au niveau de la zone de formation du SOC que nous observons à P7. Nous observons aussi une diminution de l'expression des gènes des chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques tels qu'*Ihh*, *Osx*, *Col10a1* et *Mmp13* au stade P7. Cette diminution pourrait également être liée au rôle de MGP dans la survie des chondrocytes (pré-)hypertrophiques.

Afin de confirmer le rôle de MGP dans la survie cellulaire au sein de la plaque de croissance murine, il serait intéressant de réaliser des immunomarquages avec des anticorps dirigés contre la protéine marqueur de la prolifération nommée Ki67. De même, nous souhaitons aussi étudier la mort cellulaire notamment par la réalisation de marquage TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) qui met en évidence la fragmentation de l'ADN qui prend place lors de l'apoptose.

De plus, il a été montré que le processus d'autophagie est indispensable à la survie des chondrocytes, particulièrement ceux de la zone hypertrophique, dans l'environnement avasculaire et hypoxique que représente la plaque de croissance (Bohensky et al., 2007 ; Terkhorn et al., 2007). Ainsi toute altération du processus d'autophagie, dans des modèles expérimentaux murins conduit à l'apparition de dysplasies squelettiques, incluant des retards de croissance modérés, du fait de la mort prématurés des chondrocytes (Vuppalapati et al., 2015, Kang et al., 2007 ; Cinque et al., 2015). De manière intéressante, au stade P7, nous avons

observé une accumulation de LC3B, protéine impliquée dans la formation des autophagosomes, au niveau des chondrocytes hypertrophiques de la plaque de croissance et de la zone de formation du SOC. Comme démontré auparavant, une accumulation de LC3B au sein des chondrocytes est associée à une altération du processus d'autophagie (Settembre et al., 2008 ; Moss et al., 2021). Ainsi, le retard de croissance observé et l'altération de la formation du SOC associés à une diminution de l'hypertrophie des chondrocytes pourraient être dus à une dérégulation du processus d'autophagie en absence de MGP.

Des études plus poussées sont requises afin de confirmer et de décrire le lien entre MGP et l'autophagie. Cette dernière est un processus complexe qui implique de nombreux acteurs moléculaires et est régulée par de nombreux facteurs tels que l'hypoxie ou la concentration en nutriments présente dans l'environnement (Parzych et Klionsky., 2014).

En parallèle, j'ai également réalisé des essais de marquages immunohistochimiques sur d'autres acteurs de l'autophagie tels que p62/SQSTM1 et ATG5 afin de confirmer les résultats obtenus avec les anticorps anti-LC3B. Cependant, du fait de contraintes de temps, ces marquages n'ont pas pu être réalisés sur un nombre suffisant d'échantillons ce qui n'a donc pas permis d'obtenir de résultats probants. Il serait alors intéressant de compléter ces marquages afin de confirmer les altérations de l'autophagie observées au stade P7. De même, comme pour les cultures de chondrocytes primaires, il serait intéressant de réaliser des extractions protéiques à partir de fémurs complets de souris puis d'étudier et confirmer les variations des niveaux protéiques de ces acteurs de l'autophagie, via Western blotting.

Il est également possible que le rôle de MGP dans la régulation de BMP2 et de BMP4 puisse contribuer, au moins partiellement, à l'apparition du phénotype squelettique.

Brièvement, pour rappel, les BMPs sont des membres de la superfamille des TGF $\beta$  qui sont impliqués dans la régulation de la maturation des chondrocytes (cf. partie 3.1.3.C de l'introduction), notamment en induisant l'expression du gène codant le facteur de transcription RUNX2 (Halloran et al., 2020). Plusieurs études ont montré que MGP est capable d'interagir directement avec BMP2 et BMP4 et d'inhiber la mise en place de calcifications ectopiques au niveau des artères (Bostrom et al., 2001 ; Zebboudj et al., 2001, Yao et al., 2006). Plus récemment, il a été montré, au niveau de la plaque de croissance du poulet, que la proximité des zones d'expression de MGP et BMP2 est indispensable au bon déroulement du

processus d'ossification endochondrale (Dan et al., 2012). Ceci pourrait expliquer les dérégulations de l'expression de BMP4, BMP2 et de ses gènes cibles en absence de MGP au cours du développement post-natal. De plus, les BMPs sont connues pour être impliquées dans une boucle d'expression positive avec la voie de signalisation Indian Hedgehog (Provot et al., 2005). Les dérégulations de la voie des BMPs pourraient alors expliquer les variations d'expression concomitantes des gènes impliqués dans la signalisation Hedgehog tel que *Ptch1*, *Smo* et les gènes des facteurs de transcription Gli. La stimulation de la voie des BMPs et Indian Hedgehog en absence de MGP pourrait provoquer une maturation précoce des chondrocytes, ce qui expliquerait l'augmentation de l'expression des gènes des chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques à P14 et pourrait être à l'origine du retard de croissance visible une semaine plus tard, à P21.

Afin de compléter ces résultats, des essais de marquages par immunohistochimie et hybridation *in situ* des acteurs de la voie BMP2/4 ont commencé à être réalisés, notamment des marquages avec des anticorps anti-RUNX2. A l'heure actuelle, les marquages RUNX2 n'ont été testés qu'au stade P14 et sur un nombre limité d'échantillons. Du fait de la faible intensité des marquages, même à de fortes concentrations d'anticorps (1/100<sup>ème</sup>) et avec un temps d'incubation long (30 minutes, soit la limite recommandée par le fabricant), il est difficile d'observer une différence entre les souris WT et KO. Nous sommes en train de faire des tests afin d'améliorer ces immunomarquages. De plus, des essais de marquages par hybridation *in situ* via l'utilisation de sondes antisens de l'ARNm de *Bmp2* et *Bmp4* ont également été réalisés. Cependant, du fait des nombreux problèmes techniques rencontrés notamment à cause du décollement des sections de la lame en verre, aucun résultat probant n'a pu être obtenu. Afin de résoudre ces problèmes de décollement de lames, nous avons prévu de traiter les lames en verre avec du 3-aminopropyltriéthoxysilane (TESPA), ce qui augmentera l'adhérence des sections sur les lames. Au-delà de ces problèmes de décollements d'échantillons, il est probable que le fait que nous n'utilisons pas de système d'amplification du signal peut être un frein à l'obtention d'un marquage d'intensité suffisante et/ou suffisamment discriminant entre souris WT et MGP KO lorsque nous utilisons des sondes antisens pour des ARNm moins exprimés que le collagène de type II ou X. Une modification de notre protocole d'hybridation *in situ* pour améliorer la limite de détection est ainsi en cours. De plus, de manière équivalente aux expériences réalisées *in vitro*, il pourrait être intéressant

de réaliser des expériences de Western blot pour étudier l'activation de la voie des BMPs, en utilisant des anticorps anti-SMAD phosphorylés et non phosphorylés. De même, il est prévu de réaliser des expériences de Western blot avec des anticorps Runx2, pour étudier son activation par BMP2 comme cela a été fait par d'autres équipes de recherche (Shu et al., 2011).

De manière connexe, nous avons observé une surexpression de gènes impliqués dans la régulation du cil primaire (*Kif24*, *Dync2li1*, *ATP8a2*) à P14. Le cil primaire est une organelle présente à la surface de la plupart des cellules de mammifères. Il s'agit d'une structure transitoire qui est assemblée dans les cellules quiescentes et qui est désassemblée lorsque ces dernières re-entrent dans le cycle cellulaire (Iwata et al., 2015). Dans la plaque de croissance, le cil primaire est impliqué dans la mécano-transduction, l'organisation en colonnes des chondrocytes prolifératifs et la transduction de signaux, notamment de la voie Hedgehog (Jensen et al., 2007 ; Song et al., 2007 ; Rich et al., 2012; Ruhlen et al., 2014; Yuan et Yang., 2015; Tao et al., 2019). L'assemblage /désassemblage du cil primaire et ses fonctions sont dépendants d'un système de transport intraflagellaire (IFT) qui inclut la Kinésine KIF24 et la sous-unité de la dynéine II nommée DYNC2LI1 (Rosenbaum et al., 2002 ; Pedersen et al., 2008 ; Krock et al., 2009 ; Ishikawa et al., 2011 ; Kobayashi et al., 2011 ; Kim et al., 2015 ; Miyamoto et al., 2015 ; Prevo et al., 2017 ; Jensen et al., 2018). Ainsi le rôle que joue le cil primaire dans la transduction du signal de la voie Hedgehog pourrait participer à l'augmentation de l'expression des gènes des chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques visible chez les souris MGO KO à 14 jours de vie post-natale.

Nous avons également commencé à réaliser des expériences d'immunofluorescence avec des anticorps anti- $\alpha$  tubuline acétylée et anti- $\gamma$  tubuline sur des sections d'os longs de souris MGP KO (Hafsia et al., 2020). Cependant, ce protocole est prévu pour des coupes réalisées à l'aide d'un cryostat et non des coupes classiques comme celles que je réalise. Ainsi, je n'ai pas réussi à obtenir de signal fluorescent sur mes sections de tibias et de fémurs, mais nous envisageons de réitérer ce protocole dans des conditions optimales grâce à l'utilisation d'un cryostat. Des marquages par immunofluorescence similaires sont en cours de réalisation sur des cultures primaires de chondrocytes et seront abordés dans la partie 2 des résultats.

Ensuite, de manière surprenante, lors de notre étude des mécanismes moléculaires qui prennent place en l'absence de MGP, nous avons observé une augmentation de l'expression du gène codant FGFR3 à P21, stade où le retard de croissance des souris MGP KO devient clairement visible. Durant le développement post-natal, FGFR3 régule négativement la prolifération et la maturation des chondrocytes (Iwata et al., 2000). La suractivation du gène codant FGFR3 est connue pour induire de l'achondroplasie (ACH), la dysplasie squelettique ainsi que la forme de nanisme la plus répandue chez l'Homme. Les patients ACH développent de sévères retards de croissance, sténoses, hypoplasie médio-faciale et des otites qui peuvent être associées à des pertes d'audition (Horton et al., 2007 ; Baujat et al., 2008 ; Ornitz et Legeai-Mallet., 2017). De plus, des modèles de souris surexprimant *Fgfr3* au niveau des ostéoblastes immatures développent une réduction modérée de leur densité osseuse (ostéopénie) (Duplan et al., 2021).

Il est intéressant de noter que le syndrome de Keutel, pathologie liée à des mutations perte-de-fonction du gène codant MGP (cf. partie 2.2 de l'introduction) présente de nombreux signes cliniques communs à ceux de l'achondroplasie. En effet, les patients Keutel développent également des hypoplasies médio-faciale, des retards de croissance, des otites et une perte d'audition (Teebi et al., 1998 ; Munroe et al., 1999 ; Hur et al., 2005 ; Khosroshahi et al., 2014 ; Perrone et al., 2018). De plus, même s'il n'y a pas eu d'observation à ce sujet chez les patients Keutel, les souris MGP KO présentent aussi une réduction de leur densité minérale osseuse du fait du rôle de MGP dans l'inhibition de l'ostéoclastogenèse et dans la promotion de la formation du tissu osseux par les ostéoblastes (Luo et al., 1997 ; Marulanda et al., 2017 ; Zhang et al., 2019 ; Zhang et al., 2019 ; Laurent et al., 2022). Il a également été montré que les souris FGFR3 KO, qui développent aussi une ostéopénie, présentaient une augmentation de l'expression de MGP (Valverde-Franco et al., 2004). Ainsi notre observation d'une augmentation de l'expression de *Fgfr3* à P21 et les données présentes dans la littérature indiquent un lien entre MGP et FGFR3 qui pourrait expliquer le retard de croissance observé chez les souris MGP KO.

Il est également intéressant de noter que la signalisation par FGFR3 régule négativement la boucle *Ihh*-PTHrP et BMP4, ce qui pourrait expliquer pourquoi il n'y a plus de surexpression des gènes qui leur sont associés à partir de P21 (Naski et al., 1998 ; Minina et al., 2002 ; Provot et al., 2005 ; Su et al., 2014). La suractivation de FGFR3, lors de la mise en place

d'achondroplasie, est aussi impliquée dans des dérégulations de l'assemblage/désassemblage du cil primaire ce qui entraîne un raccourcissement de ce dernier et altère la transduction des signaux de la voie Hedgehog (Bosakova et al., 2019). Alors, la régulation du cil primaire par FGFR3 pourrait aussi être impliquée dans le retour à une expression équivalente à celle des souris contrôles, des gènes du cil primaire et de la voie Hedgehog au stade P21.

De même, FGFR3 est impliqué dans la régulation négative du processus d'autophagie (Wang et al., 2015). Cependant, du fait de l'accumulation de la protéine LC3B qui prend place à un stade antérieur (P7) à celui de la surexpression de *Fgfr3* (P21), il est peu probable que la relation FGFR3-autophagie soit impliquée dans le développement du phénotype squelettique des souris MGP KO.

Afin de compléter ces données préliminaires, des essais de marquages immunohistologiques et par hybridation *in situ* ont été réalisés. Concernant, les marquages par hybridation *in situ*, nous avons eu les mêmes problèmes techniques que précédemment, à savoir un décollement des lames et une limite de détection inadaptée.

La diminution drastique de la plupart des gènes impliqués dans la maturation des chondrocytes à P28 peut s'expliquer par le fait qu'à ce stade, la plaque de croissance, la zone hypertrophique et donc la population de chondrocytes associée des souris MGP KO sont significativement réduites par rapport à celles des souris contrôles.

Enfin, il est intéressant qu'une étude portant sur des chondrocytes issus du septum nasal murin a montré que la déficience en MGP entraîne une accélération de la minéralisation de la matrice extracellulaire mais n'a pas d'impact sur la maturation des chondrocytes (Marulanda et al., 2017). De plus, une étude menée par notre laboratoire a montré une augmentation du nombre de chondrocytes hypertrophiques au niveau des anneaux cartilagineux trachéaux des souris MGP KO.

L'ensemble de ces résultats indique que la régulation de la maturation et de la survie des chondrocytes par la protéine matricielle Gla varie selon le tissu cartilagineux considéré. La réalisation d'une étude comparative des mécanismes d'action de MGP au niveau des différents cartilages pourrait ainsi permettre de mieux caractériser le rôle de cette protéine lors du développement squelettique post-natal.

### 1.3.2. Rôle de MGP dans le développement du SOC

Concernant l'altération de la formation du SOC en absence de MGP lors des premières étapes de développement post-natal, il est proposé de récupérer des échantillons d'os longs de souris entre les stades P1 et P10 et de réaliser, comme cela a été fait précédemment, des immunomarquages de l'endomucine (ECM), de MMP9, de la TNAP et de la TRAP (Hashimoto et al., 2019). La réalisation de tels marquages nous permettrait de mieux comprendre les altérations de l'invasion vasculaire qui semble prendre place en absence de MGP. Plus spécifiquement, les immunomarquages TNAP et TRAP nous permettrait aussi de comprendre si le rôle que joue MGP au niveau des ostéoblastes et des ostéoclastes a une implication dans les premières étapes de la mise en place du SOC (Julien et al., 2007, 2009 ; Koshniat et al., 2011 ; Zhang et al., 2019a ; Zhang et al., 2019b). De manière connexe, à la vue du rôle prépondérant des calcifications artérielles dans le développement squelettique, il serait intéressant de comparer le développement du SOC chez les souris MGP KO avec celui de plusieurs lignées de souris déficientes en MGP chez lesquelles le phénotype vasculaire est compensé au moins partiellement, comme les souris *Mgp*<sup>-/-</sup> ; *SM22-Mgp* ou *Mgp*<sup>-/-</sup> ; *Eln*<sup>+/-</sup> (Murshed et al., 2004 ; Marulanda et al., 2013). Enfin comme indiqué auparavant (cf. partie 3.6 de l'introduction), il serait intéressant d'étudier plus en détail le rôle de l'hormone thyroïdienne T3 dans la régulation du gène codant MGP lors de l'initiation du développement du SOC (Gomez et al., 2022).

En conclusion, les altérations de la plaque de croissance chez les souris MGP KO semblent être la résultante d'une interaction complexe et temporelle entre de nombreux acteurs moléculaires de l'ossification endochondrale tels que les BMPs, l'autophagie, la signalisation par FGFR3 et le cil primaire. De même, l'accélération de l'invasion vasculaire observée lors de la mise en place du SOC en absence de MGP pourrait impliquer les multiples rôles de MGP notamment ceux qu'elle joue dans la régulation des ostéoblastes et ostéoclastes. Plusieurs expériences supplémentaires devront néanmoins être conduites sur ces échantillons d'os longs de souris afin de confirmer les résultats préliminaires obtenus durant ces trois années de thèse.

## 2. Etude *in vitro* des acteurs moléculaires impliqués dans la régulation de la plaque de croissance

En parallèle de ces études menées sur les plaques de croissance fémorale et tibiale, nous avons réalisé des expériences *in vitro*, sur des cultures de chondrocytes primaires issus de la tête fémorale de souris WT et MGP KO âgées de 6 jours de vie post-natale.

Des expériences visant à étudier l'impact de la déficience en MGP sur la modulation du phénotype chondrocytaire par la signalisation aux FGFs et aux BMPs ont été réalisées en stimulant les cultures primaires de cellules avec différents composés (FGF2, FGF18 ou BMP2 recombinants).

### 2.1. Modulation du phénotype chondrocytaire

#### 2.1.1. Stimulation des chondrocytes par la signalisation aux FGFs

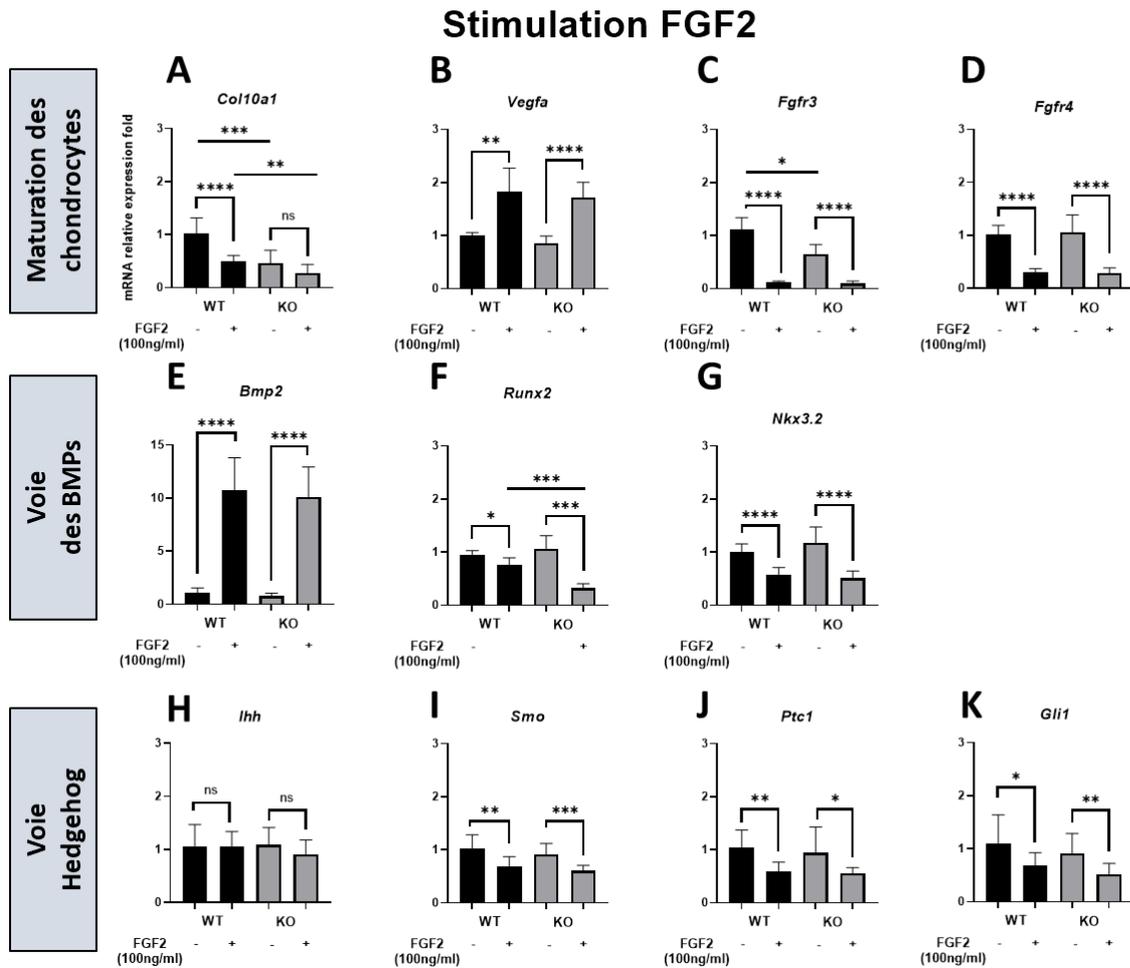
##### A. STIMULATION PAR FGF2

Premièrement, nous avons réalisé des expériences de qPCR à partir d'ADNc issus de cultures primaires de chondrocytes murins stimulés ou non avec du FGF2 recombinant à 100 ng/ml pendant 24 heures (Figure 40). Dans les chondrocytes issus de souris MGP KO, nous observons une diminution de l'expression de *Col10a1* d'un facteur  $2,2 \pm 0,16$  comparée aux chondrocytes issus de souris WT en conditions de culture standards. La stimulation avec du FGF2 induit une diminution significative de l'expression de *Col10a1*, d'un facteur  $2 \pm 0,09$ , uniquement dans les chondrocytes WT (Figure 40 A). Dans le cas de *Vegfa*, nous observons une augmentation de l'expression d'un facteur  $1,75 \pm 0,20$  en réponse à la stimulation par FGF2 mais il n'y a pas de différence significative entre chondrocytes WT et MGP KO avant ou après stimulation (Figure 40 B). Ensuite, concernant le gène codant pour FGFR3, les chondrocytes MGP KO non stimulés présentent une diminution d'expression d'un facteur  $1,5 \pm 0,14$  par rapport aux chondrocytes WT. A la suite d'une stimulation au FGF2, l'expression de *Fgfr3* diminue

fortement, d'un facteur  $8 \pm 0,06$ , dans les cellules WT et d'un facteur  $7 \pm 0,05$  dans les cellules MGP KO (Figure 40 C). De manière équivalente, nous observons une diminution de l'expression de *Fgfr4* d'un facteur  $3,3 \pm 0,07$  à la suite d'une stimulation au FGF2 dans les chondrocytes des deux génotypes (Figure 40 D).

Concernant les gènes de la voie BMP2, nous observons une forte augmentation, d'un facteur  $10 \pm 1,2$ , de l'expression du gène codant BMP2, en réponse à la stimulation mais il n'y a pas de différence entre les deux génotypes (Figure 40 E). A l'inverse, le gène cible de BMP2, *Runx2*, diminue en réponse au traitement par FGF2, cette diminution est plus marquée dans les chondrocytes MGP KO, avec une diminution d'un facteur  $3 \pm 0,1$  contre seulement un facteur  $1,3 \pm 0,07$  dans les chondrocytes WT (Figure 40 F). De même, un autre gène codant pour un facteur de transcription, *Nkx3.2*, diminue d'un facteur  $2 \pm 0,18$  en réponse à la stimulation par FGF2 mais sans différence significative entre cellules WT et MGP KO (Figure 40 G).

Enfin, nous avons également étudié plusieurs gènes impliqués dans la signalisation Hedgehog et dans le cil primaire. La stimulation au FGF2 ne semble pas avoir d'effet sur l'expression du gène *lhh* et aucune différence n'est observable entre les deux génotypes (Figure 40 H). Plus globalement, nous constatons une diminution de l'expression des gènes *Smo* (facteur  $1,5 \pm 0,12$ ), *Ptch1* (facteur  $1,7 \pm 0,12$ ) et *Gli1* (facteur  $1,7 \pm 0,15$ ) en réponse à la stimulation par FGF2 sans différence entre cellules WT et KO (Figure 40 I-K).



**FIGURE 40 : ANALYSE COMPARATIVE DE L'EXPRESSION GENIQUE DE CHONDROCYTES PRIMAIRES WT ET MGP KO STIMULES AVEC DU FGF2 RECOMBINANT**

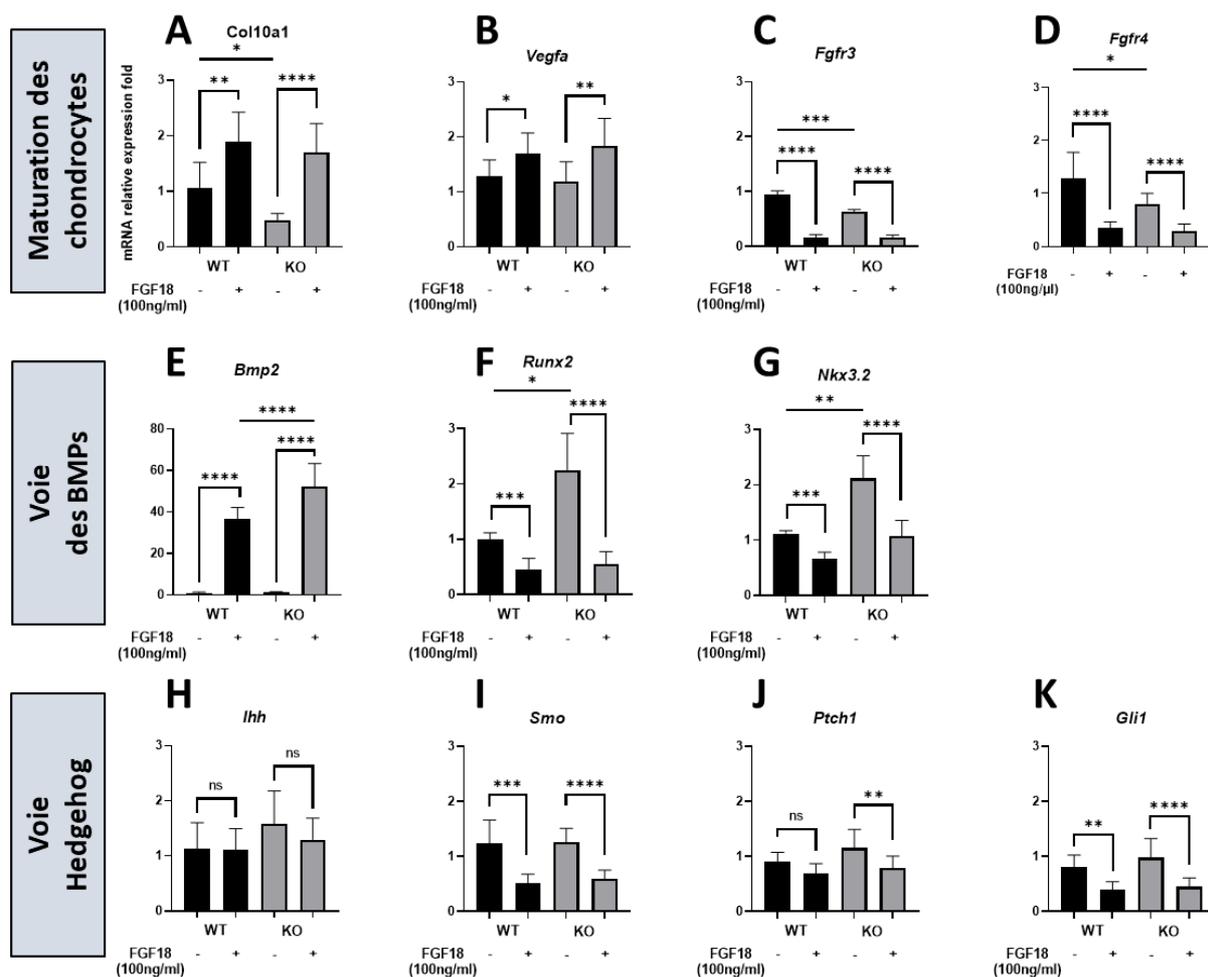
A-D. Expression relative des gènes marqueurs de l'hypertrophie *Col10a1*, *Vegfa* et des gènes codant pour *FGFR3* et *FGFR4* dans les cultures de chondrocytes primaires issus de souris WT et KO traitées avec du FGF2 recombinant (100ng/ml) ou avec la solution de resuspension du FGF2 recombinant (PBS1X 0,1% BSA) pendant 24 heures. E-G. Expression relative des gènes de la voie des BMPs : *Bmp2*, *Runx2* et *Nkx3.2*. H-K. Expression relative des gènes impliqués dans la voie Indian Hedgehog : *Ihh*, *Smo*, *Ptc1* et *Gli1*. N=3 pour chaque génotype et pour chaque condition de culture. Les valeurs numériques représentent la moyenne  $\pm$  l'écart-type. Un test t non apparié à deux échantillons a été utilisé pour déterminer la significativité statistique des résultats :  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*) et  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*).

## B. STIMULATION PAR FGF18

Nous avons également réalisé des expériences, au cours desquelles les chondrocytes ont été stimulés avec du FGF18 recombinant à 100 ng/ml pendant 24 heures (Figure 41). Comme pour la série d'expériences précédente, nous observons une diminution significative de l'expression de *Col10a1*, d'un facteur  $2 \pm 0,2$ , dans les chondrocytes MGP KO en conditions standards. Cependant, contrairement à FGF2, la stimulation au FGF18 recombinant induit une augmentation de l'expression du gène *Col10a1*, respectivement d'un facteur  $1,75 \pm 0,25$  dans les chondrocytes WT et  $3,5 \pm 0,22$  dans les souris MGP KO (Figure 41 A). De plus, nous constatons une augmentation de l'expression de *Vegfa* d'un facteur  $1,7 \pm 0,2$  en réponse à la stimulation mais pas de différence entre les deux génotypes avant ou après cette stimulation (Figure 41 B). Ensuite, nous observons une réduction de l'expression du gène codant FGFR3 d'un facteur  $1,5 \pm 0,04$  dans les cellules MGP KO par rapport aux cellules WT. La stimulation au FGF18 induit également une diminution drastique de l'expression de *Fgfr3*, respectivement d'un facteur  $6 \pm 0,03$  pour les chondrocytes WT et d'un facteur  $4 \pm 0,02$  pour les chondrocytes MGP KO (Figure 41 C). De manière équivalente, l'expression de *Fgfr4* est diminuée d'un facteur  $1,6 \pm 0,6$  dans les chondrocytes MGP KO en conditions standards de culture. La stimulation avec du FGF2 recombinant induit également une diminution de l'expression de *Fgfr4* d'un facteur  $3,75 \pm 0,15$  dans les chondrocytes WT et d'un facteur  $2,7 \pm 0,07$  dans les chondrocytes MGP KO (Figure 41 D).

Concernant la voie des BMPs, nous observons une très forte augmentation du gène codant BMP2 à la suite de la stimulation avec du FGF18. Cette augmentation est beaucoup plus marquée chez les chondrocytes MGP KO, où l'expression est augmentée d'un facteur  $50 \pm 5$  contre seulement un facteur  $30 \pm 3,4$  dans les chondrocytes WT (Figure 41 E). De plus, nous avons étudié l'expression du gène codant pour le facteur de transcription RUNX2. Ainsi en conditions standards de culture, nous avons constaté que les cellules MGP KO surexprimaient ce gène d'un facteur  $2,2 \pm 0,44$  par rapport aux cellules WT.

## Stimulation FGF18



**FIGURE 41 : ANALYSE COMPARATIVE DE L'EXPRESSION GENIQUE DE CHONDROCYTES PRIMAIRES WT ET MGP KO STIMULEES AVEC DU FGF18 RECOMBINANT**

A-D. Expression relative des gènes marqueurs de l'hypertrophie *Col10a1*, *Vegfa* et des gènes codant pour *FGFR3* et *FGFR4* dans les cultures de chondrocytes primaires issus de souris WT et KO traitées avec du FGF18 recombinant (100ng/ml) ou la solution de resuspension du FGF18 recombinant (eau qualité biologique moléculaire) pendant 24 heures. E-G. Expression relative des gènes de la voie des BMPs : *Bmp2*, *Runx2* et *Nkx3.2*. H-K. Expression relative des gènes impliqués dans la voie Indian Hedgehog : *Ihh*, *Smo*, *Ptch1* et *Gli1*. N=3 pour chaque génotype et pour chaque condition de culture. Les valeurs numériques représentent la moyenne  $\pm$  l'écart-type. Un test t non apparié à deux échantillons a été utilisé pour déterminer la significativité statistique des résultats :  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*) et  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*).

Nous avons aussi observé que la stimulation au FGF18 entraînait une diminution de l'expression de *Runx2* d'un facteur  $2 \pm 0,12$  chez les chondrocytes WT et d'un facteur  $4 \pm 0,18$  dans les chondrocytes MGP KO (Figure 41 F). De la même manière que *Runx2*, *Nkx 3.2* est surexprimé d'un facteur  $2 \pm 0,24$  en conditions standards dans les chondrocytes MGP KO et son expression diminue en réponse à la stimulation avec du FGF18, d'un facteur  $1,7 \pm 0,08$  pour les cellules WT et d'un facteur  $2 \pm 0,16$  pour les cellules MGP KO (Figure 41 G).

Enfin, comme précédemment, nous n'observons pas de variation significative d'expression du gène *Ihh* en réponse à la stimulation, de même, il n'y a pas de différence significative entre les deux génotypes (Figure 41 H). Ensuite, nous observons aussi une diminution de l'expression des gènes *Smo* (facteur  $2 \pm 0,10$ ) et *Gli1* (facteur  $2 \pm 0,10$ ) en réponse au traitement par FGF18 sans différence entre les génotypes. Cependant, une diminution significative de l'expression de *Ptc1* (facteur  $1,4 \pm 0,12$ ) est uniquement visible dans les chondrocytes MGP KO (Figures 41 I-K).

### 2.1.2. Stimulation par la voie des BMPs

#### A. STIMULATION DE L'EXPRESSION GENIQUE PAR BMP2

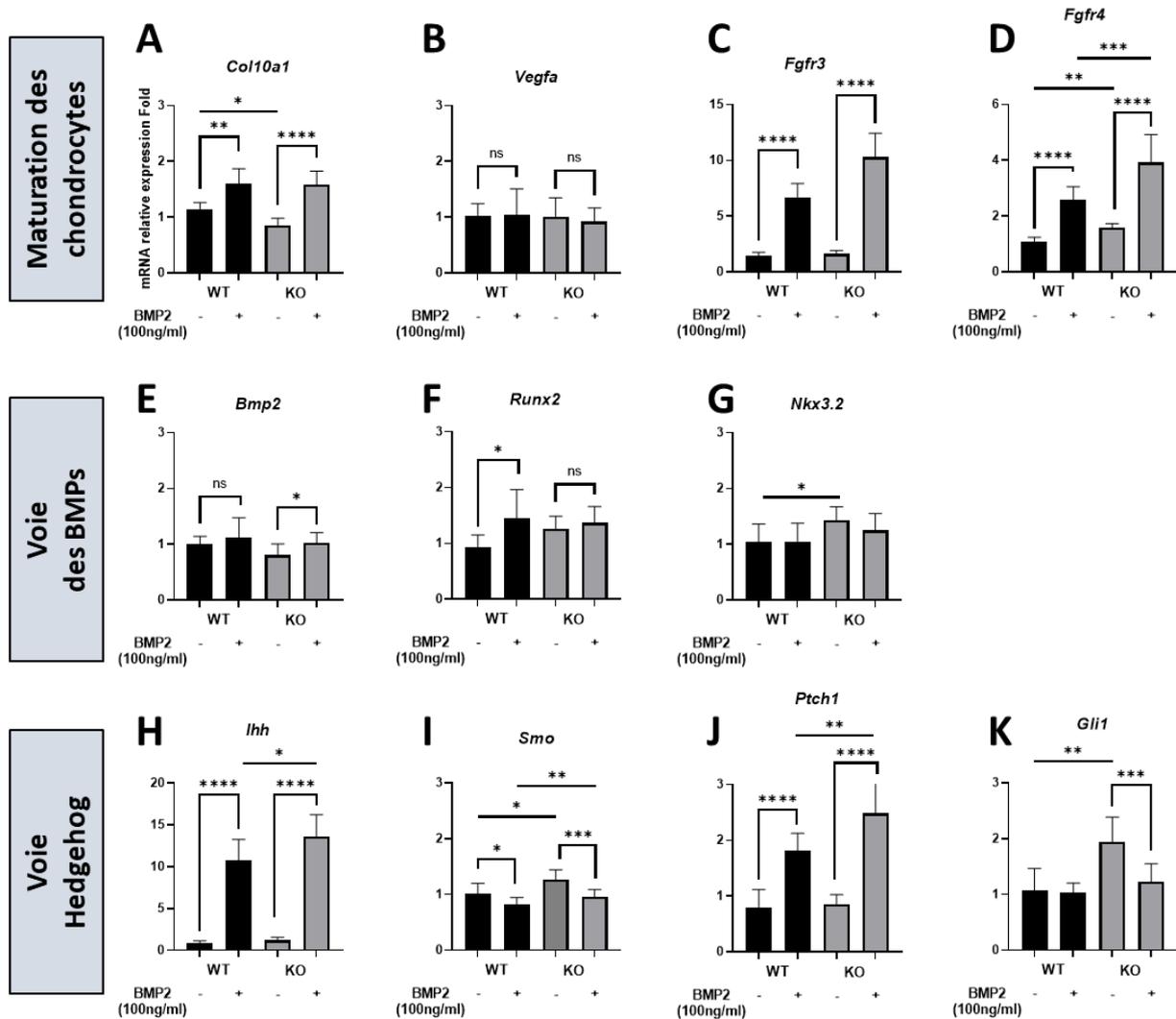
Par la suite, nous avons stimulé des cultures primaires de chondrocytes murins avec du BMP2 à 100 ng/ml pendant 24 heures (Figure 41). Tout d'abord, nous observons une diminution de l'expression de *Col10a1* d'un facteur  $1,2 \pm 0,1$  dans les chondrocytes MGP KO en conditions standards de culture. De plus, l'expression de *Col10a1* augmente en réponse à la stimulation au BMP2 recombinant, respectivement d'un facteur  $1,4 \pm 0,16$  pour les cellules WT et  $1,9 \pm 0,11$  pour les cellules MGP KO (Figure 42 A). Concernant l'expression de *Vegfa*, nous n'avons pas constaté de variation d'expression en réponse à la stimulation, ni de différence entre chondrocytes WT et MGP KO (Figure 42 B). Ensuite, contrairement aux stimulations par FGF2 et FGF18, nous avons observé une forte augmentation de l'expression de *Fgfr3* en réponse à la stimulation par du BMP2 recombinant. Il est intéressant de noter que cette augmentation est nettement plus marquée dans les cellules MGP KO, où l'expression de *Fgfr3* est augmentée d'un facteur  $6,25 \pm 1,1$  contre un facteur  $4,5 \pm 0,8$  pour les cellules WT (Figure 42 C). De plus, nous constatons une augmentation de l'expression de *Fgfr4* d'un facteur  $1,6 \pm 0,1$  dans les

chondrocytes MGP KO. La stimulation avec du BMP2 recombinant induit une augmentation de l'expression de *Fgfr4* d'un facteur  $2,5 \pm 0,3$  dans les chondrocytes des deux génotypes (Figure 42 D).

De manière générale, concernant la voie des BMPs, nous avons constaté de faibles variations d'expression en réponse à la stimulation par du BMP2 recombinant quel que soit le génotype des chondrocytes. Dans le cas du gène codant BMP2, nous n'observons qu'une faible augmentation d'expression, d'un facteur 1,25 en réponse à la stimulation et cela uniquement dans les cellules MGP KO (Figure 42 E). A l'inverse dans le cas de *Runx2*, après 24 heures de stimulation, nous observons une augmentation d'expression, d'un facteur  $1,5 \pm 0,09$  dans les chondrocytes WT mais pas dans les MGP KO (Figure 42 F). Dans le cas de *Nkx3.2*, aucune variation d'expression en réponse à la stimulation n'est visible, nous avons seulement constaté une très légère surexpression de ce gène, d'un facteur  $1,4 \pm 0,15$  en conditions standards de culture dans les cellules MGP KO (Figure 42 G).

Enfin, dans le cas de la voie Indian Hedgehog, nous avons tout d'abord observé une très nette augmentation d'expression du gène *Ihh* en réponse à la stimulation par BMP2. Cette augmentation est plus marquée dans les cellules MGP KO, où elle augmente d'un facteur  $13,6 \pm 1,1$  contre seulement un facteur  $10,7 \pm 1,16$  pour les cellules WT (Figure 42 H). Pour le gène *Smo*, nous constatons une légère augmentation d'expression, d'un facteur 1,25 en conditions de culture standards dans les cellules MGP KO. De plus, nous observons une diminution de l'expression de *Smo* d'un facteur  $1,3 \pm 0,07$  en réponse à la stimulation par BMP2 dans les deux génotypes, l'expression de ce gène reste cependant légèrement plus élevée, toujours d'un facteur  $1,25 \pm 0,05$ , dans les chondrocytes MGP KO (Figure 42 I). Dans le cas du gène *Ptch1*, nous observons une augmentation d'expression en réponse à BMP2, cette augmentation est plus marquée dans les chondrocytes MGP KO, où l'expression augmente d'un facteur  $3 \pm 0,20$  contre seulement un facteur 2 pour les chondrocytes WT (Figure 42 J). Ensuite, pour le gène *Gli1*, nous constatons une surexpression de ce gène, d'un facteur  $2 \pm 0,16$  en conditions de culture standards dans les chondrocytes MGP KO. Dans ces mêmes cellules, une diminution de l'expression de *Gli1* d'un facteur  $1,6 \pm 0,16$ , est constatée à la suite d'une stimulation par BMP2, ce qui n'est pas le cas dans les cellules WT (Figure 42 K).

## Stimulation BMP2



**FIGURE 42 : ANALYSE COMPARATIVE DE L'EXPRESSION GENIQUE DE CHONDROCYTES PRIMAIRES WT ET MGP KO STIMULES AVEC DU BMP2 RECOMBINANT**

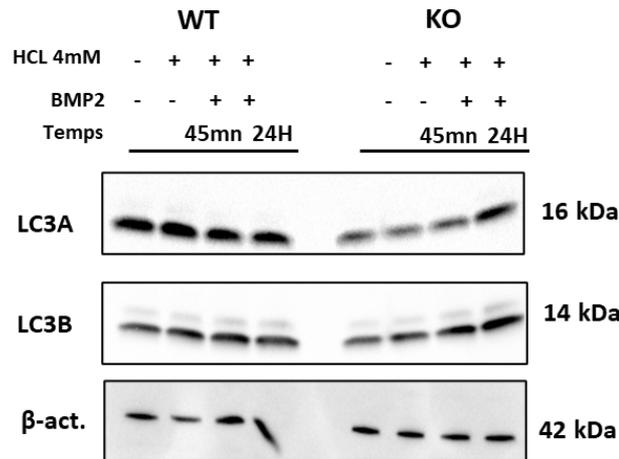
A-D. Expression relative des gènes marqueurs de l'hypertrophie *Col10a1*, *Vegfa* et des gènes codant pour *FGFR3* et *FGFR4* dans les cultures de chondrocytes primaires issus de souris WT et KO traitées avec du BMP2 recombinant (100ng/ml) ou la solution de resuspension du BMP2 (solution HCL 4mM) pendant 24 heures. E-G. Expression relative des gènes de la voie des BMPs : *BMP2*, *Runx2* et *Nkx3.2*. H-K. Expression relative des gènes impliqués dans la voie Indian Hedgehog : *Ihh*, *Smo*, *Ptch1* et *Gli1*. N=3 pour chaque génotype et pour chaque condition de culture. Les valeurs numériques représentent la moyenne  $\pm$  l'écart-type. Un test t non apparié à deux échantillons a été utilisé pour déterminer la significativité statistique des résultats :  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*) et  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*).

## B. ETUDE DE L'AUTOPHAGIE LORS DE STIMULATIONS PAR BMP2

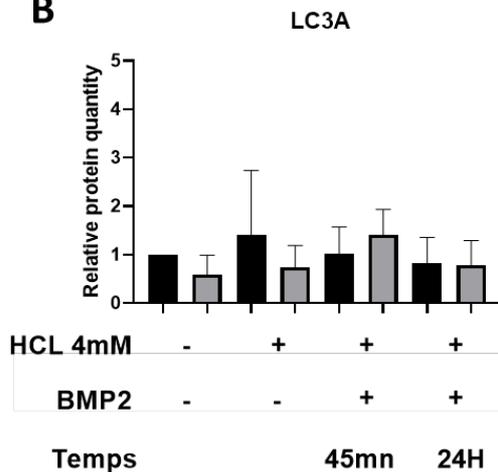
En parallèle de l'étude de l'expression des gènes à la suite d'un traitement avec du BMP2 recombinant, nous avons également étudié l'impact de ce traitement sur les niveaux protéiques d'acteurs moléculaires de l'autophagie (Figure 43). Afin d'atteindre cet objectif, nous avons réalisé des western blots à l'aide d'anticorps anti-LC3A, anti-LC3B et anti- $\beta$ -actine (contrôle).

A la suite de ces expériences, nous avons observé que les niveaux protéiques de ces deux acteurs de l'autophagie, surtout de LC3A, semblent être plus faibles dans les chondrocytes MGP KO stimulés ou non au BMP2 (Figure 43 A). Ces observations semblent aller de pair avec les quantifications relatives des niveaux protéiques à l'aide du logiciel ImageLab. En effet dans le cas de LC3A, la quantité relative de protéines tend à diminuer d'un facteur 1,7 dans les cultures de chondrocytes MGP KO contrôles (SVF 1% uniquement) et contrôle « vehicle » (SVF 1% avec la solution de resuspension du BMP2 recombinant, à savoir une solution d'acide chlorhydrique 4mM par rapport aux chondrocytes WT. A la suite d'une stimulation au BMP2 de courte durée (45 minutes), les niveaux protéiques de LC3A semblent augmenter d'un facteur 2 dans les chondrocytes MGP KO, ils sont alors légèrement supérieurs (d'un facteur 1,4) à ceux des cellules WT. A la suite d'un traitement de 24 heures, les niveaux protéiques des chondrocytes WT et MGP KO semblent diminuer et tendent à être équivalents (Figure 43 B). Pour LC3B, on retrouve également cette tendance à la diminution d'un facteur 1,7 dans les cultures de chondrocytes MGP KO stimulés ou non avec du BMP2. De même, après 24 heures de stimulation, les niveaux de LC3B tendent à augmenter d'un facteur 2 et à être équivalents à ceux des cellules WT. Après stimulation de 24 heures, les niveaux protéiques de LC3B semblent à diminuer chez les deux génotypes, la quantité de cette protéine tend à être plus basse d'un facteur 1,6 dans les cellules MGP KO par rapport aux cellules WT (Figure 43 C).

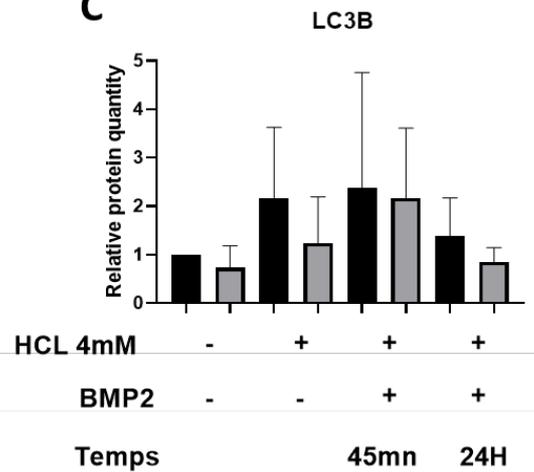
**A**



**B**



**C**



**FIGURE 43 : ANALYSE DES NIVEAUX PROTEIQUES DES ACTEURS MOLECULAIRES DE L'AUTOPHAGIE DANS DES CHONDROCYTES WT ET MGP KO STIMULES AVEC DU BMP2 RECOMBINANT**

A. Expériences de Western blot réalisées sur des extraits protéiques issus de culture primaires de chondrocytes WT et MGP KO non traités (milieu SVF 1% uniquement), traités avec la solution de re suspension HCL 4mM (contrôle « vehicle ») ou traités avec du BMP2 recombinant (100 ng/ml) pendant 45 minutes ou 24 heures. Des anticorps anti-LC3A et anti-LC3B ont été utilisés afin de mettre en évidence les acteurs moléculaires de l'autophagie présents dans ces extraits protéiques. B-C. Quantification relative des niveaux protéiques de LC3A et LC3B présents dans les extraits protéiques WT et MGP KO à l'aide du logiciel ImageLab. Les niveaux protéiques sont normalisés par rapport à ceux présents dans les échantillons WT non traités. N=3 pour chaque génotype et pour chaque condition de culture. Les valeurs numériques représentent la moyenne  $\pm$  l'écart-type. Un test t non apparié à deux échantillons a été utilisé pour déterminer la significativité statistique des résultats :  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*) et  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*).

### 2.1.3. Etude du cil primaire lors des stimulations aux FGFs et aux BMPs

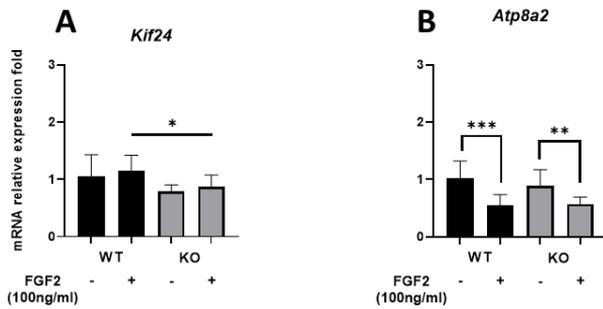
Lors des différentes expériences de stimulations des cultures de chondrocytes primaires, nous avons également étudiés l'expression de gènes impliqués dans le cil primaire (Figure 44).

Lors des expériences de stimulation au FGF2 recombinant, nous avons constaté une légère diminution, d'un facteur  $1,3 \pm 0,1$  de l'expression du gène *Kif24* dans les chondrocytes MGP KO par rapport aux chondrocytes WT sans effet significatif de la stimulation (Figure 44 A). A l'inverse, nous avons observé une diminution d'expression d'*Atp8a* d'un facteur  $1,7 \pm 0,15$  pour les chondrocytes des deux génotypes (Figure 44 B).

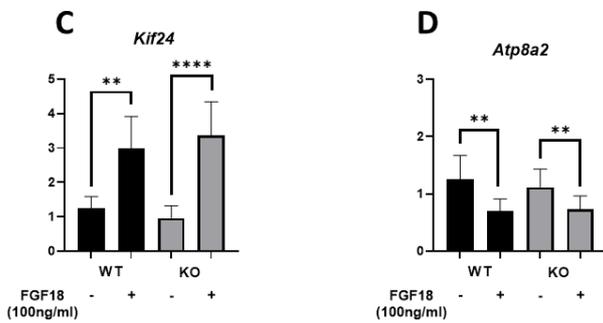
Pour les stimulations au FGF18 recombinant, nous observons une augmentation de l'expression de *Kif24* d'un facteur  $3 \pm 0,4$  après stimulation dans les chondrocytes WT et MGP KO, sans variation significative entre les génotypes (Figure 44 C). Comme dans le cas des stimulations au FGF2, nous constatons une diminution significative d'expression, d'un facteur  $1,7 \pm 0,12$  du gène *Atp8a2* dans les chondrocytes des deux génotypes (Figure 44 D).

Enfin pour les stimulations au BMP2 recombinant, aucune différence significative n'est visible pour les gènes *Kif24* et *Dync2li1*, quelles que soient les conditions de culture ou le génotype des cellules. Concernant le gène *Kif22*, seule une légère augmentation d'expression, d'un facteur  $1,4 \pm 0,12$  est observable en réponse à la stimulation chez les souris MGP KO (Figure 44 E-G).

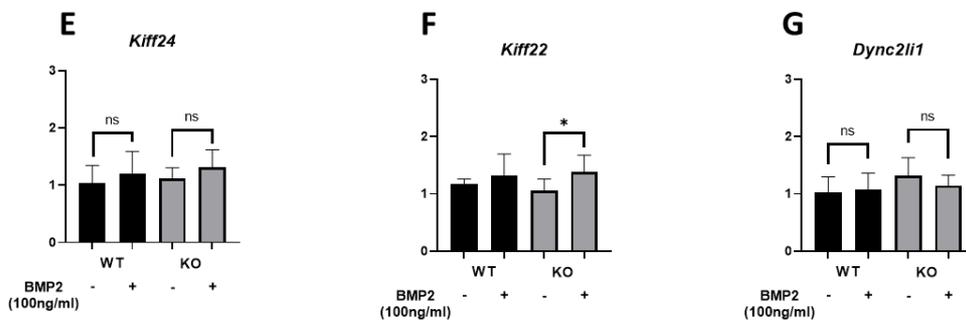
## Stimulation FGF2



## Stimulation FGF18



## Stimulation BMP2



**FIGURE 44 : ANALYSE DE L'EXPRESSION DE GENES LIES AU CIL PRIMAIRE DE CHONDROCYTES PRIMAIRES WT ET MGP KO STIMULES AVEC DU FGF2, FGF18 OU BMP2 RECOMBINANT**

A & B. Expression des gènes liés au cil primaire *Kif24* et *Atp8a2* dans des cultures de chondrocytes primaires traités avec du FGF2 recombinant ou avec la solution de re-suspension du FGF2 (PBS1X 0,1% BSA). C & D. Expression des gènes liés au cil primaire *Kif24* et *Atp8a2* dans des cultures de chondrocytes primaires traités avec du FGF18 recombinant ou avec la solution de re-suspension du FGF18 (eau qualité biologie moléculaire). E-G. Expression des gènes liés au cil primaire *Kif24*, *Kif22* et *Dync2li1* dans des cultures de chondrocytes primaires traités avec du BMP2 recombinant ou avec la solution de resuspension du BMP2 (solution HCL 4mM). Un test t non apparié à deux échantillons a été utilisé pour déterminer la significativité statistique des résultats :  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*) et  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*).

## 2.2. Discussion

Tout d'abord, il est intéressant de noter que pour l'ensemble des expériences de traitements de chondrocytes murins avec des protéines recombinantes, nous observons une expression réduite de *Col10a1* dans les chondrocytes issus de souris MGP KO par rapport à ceux issus de souris WT. Comme évoqué dans la partie *in vivo* des résultats, il a été montré que MGP est impliquée dans la survie des chondrocytes prolifératifs et hypertrophiques (Yagami et al., 1999 ; Newman et al., 2001). Ainsi cette diminution de l'expression de *Col10a1* pourrait être due au rôle de MGP dans la survie cellulaire et pourrait expliquer la réduction de la plaque de croissance et de la zone hypertrophique que nous observons sur les sections histologiques. Une étude comparative de la prolifération et de l'apoptose des chondrocytes murins MGP KO et WT est prévue afin de confirmer cette association. Pour ce faire, nous souhaitons réaliser des expériences de formation de colonies en ensemençant des boîtes de Pétri avec un nombre défini de chondrocytes. Des marquages par immunofluorescence avec des anticorps anti-Ki67 et anti-caspase 8 pour étudier respectivement la prolifération et l'apoptose des chondrocytes sont également prévus.

### 2.2.1. Effet de la stimulation par la voie des FGFS sur les chondrocytes MGP KO

#### A. ETUDE DE LA STIMULATION PAR FGF2

FGF2 est l'un des premiers membres de la famille des FGFs à avoir été identifié, il possède une affinité pour chacun des 4 récepteurs aux FGFs. De plus, il est exprimé dans la plupart des types cellulaires dont les ostéoblastes et les chondrocytes et est impliqué dans le développement du squelette appendiculaire (Fallon et al., 1994 ; Su et al., 2014). Il a été démontré que des traitements d'explants de membres murins avec du FGF2 à des stades embryonnaires entraînaient une diminution d'expression d'*Ihh* et du collagène de type X (Minina et al., 2002). Il a également été observé que la liaison de FGF2 au récepteur FGFR3 régule la prolifération des chondrocytes via l'inhibition de la voie Indian Hedgehog (Deng et al., 1996). Ce rôle de FGF2 dans la régulation de la maturation des chondrocytes pourrait expliquer la diminution d'expression de *Col10a1* et des gènes impliqués dans la signalisation

Hedgehog que nous observons dans nos cultures primaires de chondrocytes murins. Le rôle que joue la signalisation aux FGFs dans la régulation du cil primaire, notamment par le biais de FGFR3 pourrait aussi avoir un impact négatif sur les gènes de la voie Hedgehog (Martin et al., 2018 ; Bosakova et al., 2019). Ceci pourrait expliquer la diminution des gènes de la voie Hedgehog que nous observons après stimulation avec du FGF2 recombinant. Cependant, le cil primaire ne semble pas impacté par la stimulation de la voie des FGFs.

De plus, il a été démontré que FGF2 est capable de stimuler l'angiogenèse *in vitro* et il est suggéré que cette protéine est impliquée dans la mise en place de la néovascularisation lors du développement d'arthrose (Montesano et al., 1986 ; Im et al., 2007 ; Walsh et al., 2007 Yan et al., 2011). Ce rôle de FGF2 dans l'angiogenèse pourrait alors expliquer l'augmentation de l'expression du gène codant pour VEGF-A observé dans les chondrocytes des deux génotypes après stimulation.

De manière intéressante, il a été montré que des stimulations avec du FGF2 recombinant bloquaient partiellement l'augmentation de l'expression de *Runx2* qui prend place au cours du temps dans les cultures primaires de chondrocytes articulaires (Wang et al., 2004). Ceci pourrait expliquer la plus faible expression du gène codant RUNX2 que nous observons à la suite d'une stimulation avec du FGF2 recombinant. De plus, les chondrocytes MGP KO présentent une diminution plus importante de l'expression de *Runx2*, ce qui pourrait suggérer un rôle de MGP dans la régulation de l'expression de ce gène en dehors de sa capacité à inhiber BMP2. Ensuite, la diminution de l'expression de *Nkx3.2* que nous observons chez les chondrocytes stimulés pourrait être due à l'altération de la boucle IHH/PTHrP. En effet, il a été montré que PTHrP est capable de stimuler l'expression de *Nkx3.2* et que l'expression de *Pthrp* est régulée par *Ihh* (Vortkamp et al., 1996 ; Provot et al., 2006).

Enfin, nous avons observé un niveau d'expression du gène codant FGFR3 plus faible dans les chondrocytes MGP KO par rapport au WT. Lors de la réalisation de qPCR sur des fémurs complets de souris, nous avons également observé une diminution significative de l'expression de FGFR3 au stade P7, suivie par une augmentation importante de son expression au stade P21. Ces variations d'expression d'un gène clé de la régulation de la plaque de croissance pourrait expliquer le retard modéré présenté par les souris MGP KO. De plus, nous observons une diminution drastique de l'expression de *Fgfr3* après stimulation des cellules avec du FGF2 recombinant, ce qui a déjà été décrit dans la littérature (Yan et al., 2011).

Cependant, si nous observons des variations d'expression de gènes impliqués dans la maturation des chondrocytes après stimulation au FGF2 recombinant, nous n'observons pas de différences significatives entre les cultures de cellules WT et MGP KO pour la grande majorité de ces gènes. Ceci peut s'expliquer par le fait que la signalisation par FGF2 ne soit pas impliquée de manière directe mais plutôt indirectement ou partiellement dans le phénotype squelettique que développent les souris déficientes en MGP. Ces observations pourraient également tenir du fait que le phénotype squelettique des souris MGP soit un phénotype modéré, il est alors difficile d'observer une différence entre les chondrocytes WT et MGP KO lors de stimulation sur des temps courts (24 heures) même avec de fortes doses de FGF2 recombinant. Ainsi, il est proposé de réaliser des expériences équivalentes avec plusieurs doses différentes de FGF2 recombinant et plusieurs temps de stimulation afin de mieux discriminer l'effet du traitement sur les deux génotypes. De même, nous avons également prévu de réaliser des cultures primaires de chondrocytes que nous co-traiterons avec du FGF2 et avec des inhibiteurs de la signalisation aux FGFs tels que la molécule PD173074 (inhibiteur compétitif de FGFR1 et FGFR3) afin de moduler plus finement cette voie.

## B. ETUDE DE L'EFFET DE LA STIMULATION PAR FGF18

Dans le cas des stimulations avec du FGF18 recombinant, ligand de FGFR3 et 4, nous observons une augmentation de l'expression de *Col10a1* dans les cultures de chondrocytes WT et MGP KO. En effet, il a été démontré que contrairement au rôle répresseur de FGF18 décrit *in vivo*, que des stimulations *in vitro* de chondrocytes primaires ou de cellules ATDC5 avec du FGF18 favorisent la prolifération et la maturation des chondrocytes (Shimoaka et al., 2002 ; Davidson et al., 2005). De plus, FGF18 est un des facteurs requis pour permettre l'expression de *Vegfa* au niveau des chondrocytes hypertrophiques et pour l'invasion vasculaire de la plaque de croissance (Liu et al., 2007). Ce rôle de FGF18 dans l'angiogenèse expliquerait alors l'augmentation de l'expression de *Vegfa* observée après stimulation des chondrocytes murins. Il a également été décrit que FGF18 est capable de stimuler l'expression des BMPs chez les chondrocytes en réprimant l'expression de Noggin, inhibiteur des BMPs (Reinhold et al., 2004). Ce rôle de FGF18 dans la stimulation des BMPs pourrait expliquer la très forte augmentation de l'expression du gène codant BMP2 observée dans les chondrocytes murins

stimulés. De plus, l'augmentation d'expression de *Bmp2* qui est plus importante chez les souris MGP KO pourrait s'expliquer par le rôle que tient MGP dans la régulation de l'activité de cette protéine. Ainsi l'absence de MGP favoriserait l'induction de la voie BMP2 à la suite de la stimulation par FGF18.

Comme pour la stimulation avec du FGF2, nous observons une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la signalisation Hedgehog après traitement avec du FGF18. Cette diminution serait également due à la régulation négative qu'exerce les FGFs sur cette voie. Du fait de l'implication de la voie Indian Hedgehog dans la stimulation de l'expression de *Runx2* et *Runx3*, il est probable que l'inhibition de cette voie soit responsable de la diminution d'expression de *Runx2* observable après stimulation (Kim et al., 2013). De même, la diminution de l'expression de *Nkx3.2* après stimulation peut aussi s'expliquer par une altération de la boucle IHH/PTHrP. Il est intéressant de noter que dans cette série d'expériences, les expressions de *Runx2* et *Nkx3.2* en conditions standards de culture ainsi que l'effet de la stimulation par FGF18, sont aussi importantes chez les souris MGP KO que chez les souris WT. L'expression de ces gènes tend également à être légèrement plus élevée dans les autres séries d'expériences même si elle n'est pas statistiquement significative. Du fait que *Runx2* et *Nkx3.2* soient également des gènes cibles de BMP2, il est possible que cette augmentation chez les cellules MGP KO s'explique par le rôle que MGP tient dans la régulation de l'activité de BMP2. Ensuite, l'augmentation de l'expression du gène codant KIF24, protéine impliquée dans le désassemblage du cil primaire pourrait s'expliquer par le rôle d'inhibiteur que joue FGFR3 dans la régulation du cil primaire. De plus, le rôle du cil primaire dans la transduction de signaux de la voie Indian Hedgehog pourrait aussi expliquer, au moins partiellement, l'inhibition de cette voie après stimulation des cellules.

Enfin, nous retrouvons la diminution d'expression de FGFR3 dans les chondrocytes MGP KO que nous avons déjà observée. De même, nous avons constaté une diminution de l'expression de *Fgfr3* à la suite de la stimulation dans les chondrocytes des deux génotypes. Il est possible que cette diminution de l'expression de *Fgfr3* à la suite d'une forte stimulation avec un de ces ligands fasse partie d'une boucle de rétrocontrôle négatif.

De même que pour FGF2, nous souhaiterions aller plus loin dans la comparaison de la réponse des chondrocytes murins à des stimulations au FGF18 recombinant. Pour ce faire, il est prévu de réaliser des stimulations de durée différentes et de tester plusieurs doses de FGF18

recombinant. De plus, des expériences avec des inhibiteurs de la signalisation aux FGFs seront réalisées afin de moduler plus précisément cette signalisation.

### 2.2.2. Effet de la stimulation par la voie des BMPs sur les chondrocytes MGP KO

#### A. ETUDE DE L'EFFET DE LA STIMULATION PAR BMP2

Concernant les stimulations avec du BMP2 recombinant, nous observons une augmentation de l'expression de *Col10a1* chez les chondrocytes stimulés. En effet, il a été montré dans des cultures de chondrocytes pré-hypertrophique de poulet que les BMPs étaient impliquées dans la stimulation de l'expression du gène codant le collagène de type X par l'acide rétinoïque (Adams et al., 2003).

Ensuite, nous avons observé une augmentation importante de l'expression de *Fgfr3* à la suite de la stimulation des cellules par BMP2. Il a été décrit dans la littérature que BMP2 est capable de stimuler l'expression de *Fgfr3* et d'induire la différenciation chondrogénique des cellules souches mésenchymateuses pluripotentes de la lignée C3H10T1/2. Nous pouvons émettre l'hypothèse que BMP2 est aussi capable de stimuler l'expression de FGFR3 dans les chondrocytes primaires murins. Il est intéressant de noter que l'effet du BMP2 sur l'expression de *Fgfr3* est plus important dans les chondrocytes MGP KO par rapport aux cellules WT et pourrait s'expliquer par le rôle que tient MGP dans la régulation de BMP2. De plus, dans les os longs de souris MGP KO, nous avons constaté une augmentation d'expression du gène codant BMP2 au stade P14 (maintenue à P21) suivie par une augmentation d'expression de *Fgfr3*. Il est alors possible que l'absence de MGP favorise l'activité de BMP2, ce qui suractivera le gène codant FGFR3 et que cet enchaînement d'événements moléculaires participe à la mise en place du retard de croissance.

De plus, le BMP2 recombinant stimule très fortement l'expression du gène codant pour Indian Hedgehog et son récepteur Patched 1. Comme indiqué auparavant, les BMPs et la signalisation Hedgehog sont dans une boucle de rétrocontrôle positif, ce qui permet d'expliquer l'effet de BMP2 sur les gènes *Ihh* et *Ptch1* (Provot et al., 2005). De plus, la stimulation des chondrocytes avec du BMP2 induit une légère diminution d'expression des gènes *Smo* et *Gli1*. Nous

observons, encore une fois, un effet plus important de la stimulation avec du BMP2 recombinant sur les chondrocytes MGP KO, vraisemblablement du fait du rôle que tient MGP dans la régulation de BMP2.

Ensuite, l'absence de variation d'expression de *Kif24* suggère que l'effet de BMP2 sur la signalisation Hedgehog n'est pas médié par le cil primaire. Les variations d'expressions de gènes liés au cil primaire que nous observons dans les os longs de souris pourraient être due à d'autres mécanismes moléculaires.

Enfin, de manière surprenante, l'expression des gènes *Runx2*, *Nkx3.2* et *Vegfa* qui sont connus pour être régulés par BMP2 n'est que peu voire pas modifiée dans les chondrocytes stimulés. Ceci peut s'expliquer par le fait que le traitement de cellules n'est pas suffisamment long pour observer un effet important sur l'expression de ces gènes. En effet, en prenant l'exemple de *Vegf*, une augmentation d'expression n'est observée qu'après 48 heures de traitement avec du BMP2 recombinant (Chen et al., 2008).

Ainsi, de même que pour les autres séries d'expériences, nous avons prévu de réaliser des traitements au BMP2 recombinant sur plusieurs temps et avec plusieurs doses. De plus, nous avons déjà réalisé des expériences de culture de chondrocytes traités avec du BMP2 et des inhibiteurs de cette voie sur un nombre suffisant d'échantillons. Nous avons choisi d'utiliser de la dorsomorphine à une concentration de 10 mM, qui est un composé pharmacologique capable d'inhiber principalement la phosphorylation des SMADs 1/5/8 médiée par le récepteur aux BMPs de type I (Yu et al., 2008). Nous avons également traité les chondrocytes avec la protéine Noggin (100 ng/ml), qui est capable d'empêcher la fixation de BMP2 à son récepteur (Zimmerman et al. 1996 ; MacMahon et al., 1998). Cependant du fait de contraintes de temps, je n'ai pas pu compléter les qPCRs sur ces deux séries d'expériences.

## B. ETUDE DE L'AUTOPHAGIE

Concernant l'étude de l'autophagie, nos expériences de western blot indiquent une diminution des niveaux protéiques de LC3A et LC3B en conditions de culture standards dans les chondrocytes MGP KO. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus par immunohistologie, qui montraient une accumulation de LC3B au niveau de la zone hypertrophique de la plaque de croissance. Ceci peut s'expliquer par le fait que ce modèle ne reproduit pas la maturation des chondrocytes ni le microenvironnement avasculaire, hypoxique et pauvre en nutriments qui est présent au niveau de la plaque de croissance. De plus les têtes fémorales utilisées pour la mise en culture de ces chondrocytes sont récupérées sur des souris âgées de 6 jours de vie post-natale, soit un stade légèrement plus précoce que celui où nous observons une augmentation de l'immunomarquage LC3B. Les premiers jours du développement post-natal entraînent des changements rapides drastiques du cartilage de croissance (comme la mise en place du SOC par exemple), ce qui pourrait alors expliquer pourquoi, même avec 1 seul jour de différence, nous n'observons pas de résultats équivalents entre ces expériences. Enfin, il est possible que MGP ne régule pas le processus d'autophagie de la même façon au niveau des chondrocytes prolifératifs de la tête fémorale et les chondrocytes hypertrophiques de la plaque de croissance.

Ensuite, les effets des stimulations avec du BMP2 recombinant sont quant à eux plus difficiles à déterminer du fait de l'absence de variations significatives. Il semblerait tout de même que ces traitements tendent à induire le processus d'autophagie et que cette induction est légèrement plus marquée dans les cellules MGP KO.

Afin de mieux appréhender le rôle de MGP dans la régulation du processus d'autophagie, nous avons prévu de réaliser des expériences au cours desquelles nous modulerons directement le processus d'autophagie par le biais d'inhibiteurs tels que la rapamycine ou la bafilomycine. Grâce à une collaboration avec un laboratoire spécialisé dans l'étude de l'autophagie, nous sommes actuellement en discussion pour étudier l'assemblage des autophagosomes au sein de nos cultures de chondrocytes déficients en MGP par le biais de la microscopie électronique.

Les expériences de modulation des acteurs moléculaires de la plaque de croissance ne nous ont apporté que peu d'informations quant à l'implication du cil primaire dans le développement du phénotype squelettique des souris MGP KO. Afin d'étudier plus en détail le rôle de cette organelle, nous sommes en train de réaliser des marquages par immunofluorescence avec des anticorps anti- $\alpha$ -tubuline acétylée et anti- $\gamma$ -tubuline sur des

cultures primaires de chondrocytes, de manière analogue à ceux que nous réalisons sur des coupes histologiques (Hafsia et al.,2020).

De manière plus générale, il serait intéressant que notre équipe développe un modèle *in vitro* reproduisant la maturation des chondrocytes lors de l'ossification endochondrale afin de s'affranchir de certaines des limitations de notre modèle actuel. Pour ce faire, nous pourrions par exemple réaliser des cultures de micro-masses de cellules mésenchymateuses qui est une technique maîtrisée par d'autres membres du laboratoire ou encore réaliser des cultures d'explants de cartilage de croissance murin (Mello et Tuan., 1999 ; Sergerie et al., 2011).

En conclusion, ces expériences *in vitro* nous ont permis de confirmer que les chondrocytes issus de souris MGP KO présentent des variations d'expression de gènes tels que *Col10a1*, *Fgfr3*, *Runx2* ou *Nkx3.2* et du processus d'autophagie. De plus, la modulation des voies des FGFs et BMPs a montré que les chondrocytes MGP KO présentaient généralement une réponse accentuée aux stimulations par rapport aux cellules WT. Ces résultats suggèrent que MGP est impliquée dans le contrôle de la réponse des chondrocytes vis-à-vis de stimuli extracellulaires. Des expériences complémentaires sont et seront réalisées afin de mieux comprendre le rôle que joue MGP au sein du réseau moléculaire complexe qui régule le devenir des chondrocytes.

### 3. Rôle de la protéine matricielle Gla dans le développement de l'arthrose

Comme indiqué dans la partie 4.2 de ce manuscrit, ces dernières années, plusieurs études récentes ont associé la vitamine K et MGP à l'arthrose, pathologie articulaire humaine la plus répandue dans le monde. Il a en effet été montré que des polymorphismes du gène codant MGP sont associés au développement de l'arthrose.

Dans ce contexte, nous avons choisi d'utiliser le modèle murin de déficience en MGP pour étudier le développement de cette pathologie. Notre choix s'est d'abord porté sur l'étude du développement d'arthrose spontanée, lié au vieillissement.

Cependant, du fait de l'espérance de vie limitée des souris MGP KO, nous avons décidé de mettre en place le modèle d'arthrose lié au vieillissement à partir de souris hétérozygotes (*Mgp*<sup>+/-</sup>) codant pour le gène MGP.

Les articulations tibio-fémorales de souris WT (*Mgp*<sup>+/+</sup>) et hétérozygotes (*Mgp*<sup>+/-</sup>) ont ainsi été récupérées à 12, 15, 18, 20 et 24 mois de vie post-natale.

#### 3.1. Données histologiques

Les genoux de 3 souris WT (*Mgp*<sup>+/+</sup>) ont été comparés à ceux des souris hétérozygotes pour le gène codant MGP (*Mgp*<sup>+/-</sup>) après coloration des tissus articulaires à la Safranine O/Fast green et au bleu de Toluidine. La safranine et le bleu de toluidine marquent le contenu en protéoglycanes alors que le fast-green rend compte de la teneur en collagènes (Figure 45).

Aux stades de développement post-natal 12 et 15 mois, aucune souris ne présente de signe d'arthrose et cela quel que soit leur génotype (données non montrées).

Seuls les résultats à 18 mois sont donc présentés ici.

### *3.1.1. Lésions articulaires chez les souris WT (*Mgp*<sup>+/+</sup>)*

Aucune modification majeure du cartilage articulaire n'est observée chez les 3 souris WT étudiées.

Pour 2 d'entre elles, les surfaces cartilagineuses sont lisses et les colorations à la Safranine O/Fast green (Figure 45 A & B) et au bleu de Toluidine (Figure 45 G & H) ne montrent pas de perte du contenu en protéoglycanes et en collagènes.

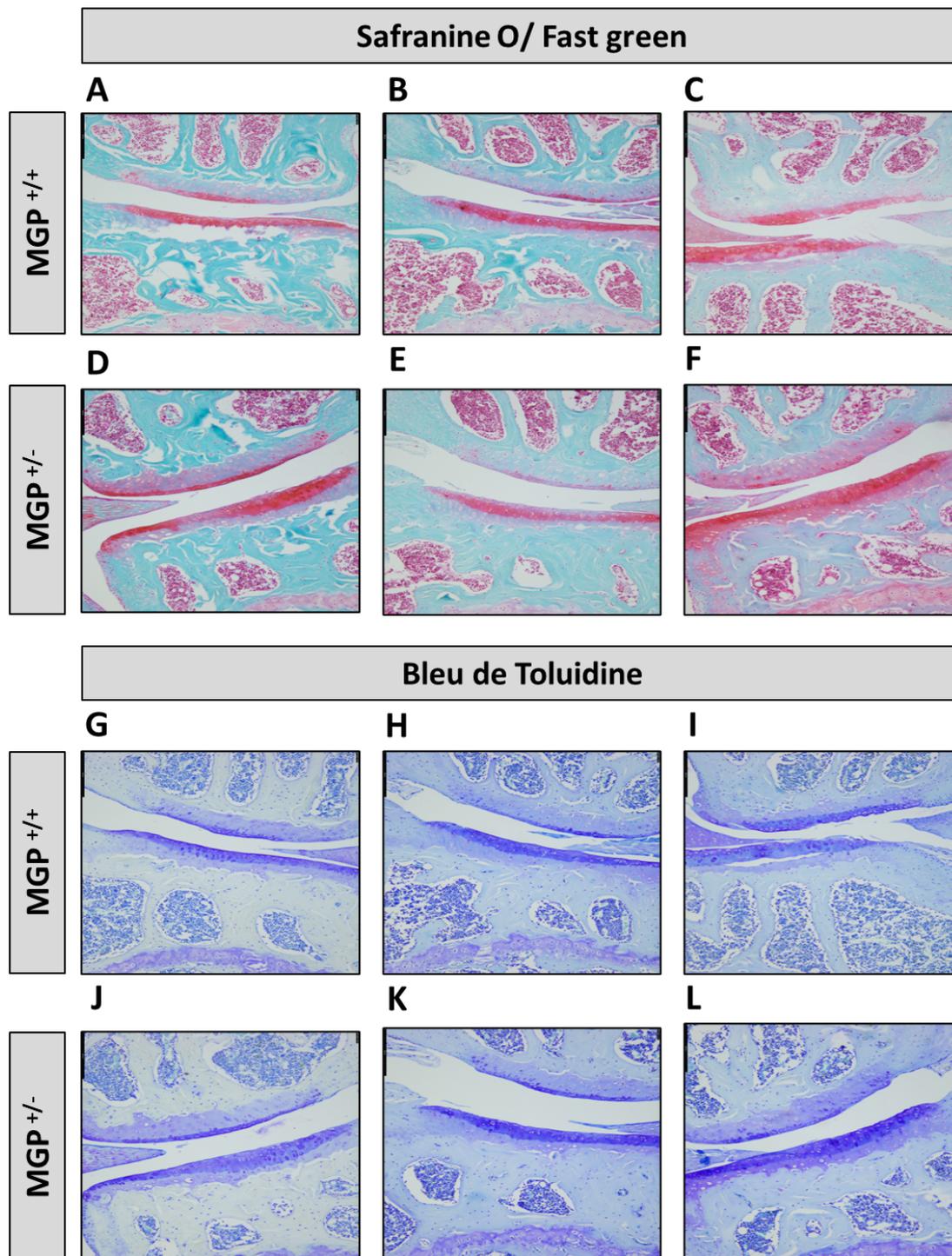
Cependant, un début de dégénération du cartilage a été observé chez le troisième individu. En effet, la surface du cartilage articulaire présente un aspect irrégulier, en particulier au niveau du plateau tibial où des fibrillations sont observées. La perte de coloration à la Safranine O/Fast green et au bleu de Toluidine (Figure 45 C & I) témoin du contenu en protéoglycanes et en collagènes, confirme les lésions articulaires chez ce troisième individu.

### *3.1.2. Lésions articulaires chez les souris hétérozygotes (*Mgp*<sup>+/-</sup>)*

Comme pour les souris WT, les données histologiques obtenues chez les souris hétérozygotes n'indiquent pas d'atteintes majeures au niveau articulaire.

Nous observons uniquement une légère décoloration, qui traduit une faible perte matricielle, chez une des souris au niveau du plateau tibial mais pas du condyle fémoral (Figures 45 D et J). Une irrégularité de la surface du cartilage du plateau est également mise en évidence chez cet animal.

Les genoux des 2 autres souris analysées ne montrent pas de modifications histologiques écartant toute apparition d'arthrose chez ces individus (Figures 45 E, F, K et L).



**FIGURE 44 : EVALUATION DE L'ARTHROSE CHEZ DES SOURIS WT ( $MGP^{+/+}$ ) ET HÉTÉROZYGOTES POUR LE GÈNE CODANT MGP ( $MGP^{+/-}$ ) ÂGÉES DE 18 MOIS**

A-F. Sections frontales de genoux de souris WT ( $Mgp^{+/+}$ ) et hétérozygotes ( $Mgp^{+/-}$ ) pour le gène codant MGP âgées de 18 mois, colorées avec une solution Safranin O 0,01% et contre-colorées avec une solution de Fast green 0,03%. G-L. Sections frontales de genoux de souris WT et hétérozygotes pour le gène codant MGP âgées de 18 mois et colorées avec une solution de Bleu de Toluidine 0,1%. Les colorations à la Safranin O/ Fast green et au bleu de Toluidine ont été réalisées sur des sections adjacentes. N= 3 pour chaque génotype et chaque coloration.

## 3.2. Discussion

Les résultats obtenus sur les modèles murins de vieillissement indiquent que les souris WT et hétérozygotes présentent seulement un début d'arthrose à 18 mois de vie. Pourtant, il est connu dans la littérature que les souris de fond génétique C57BL/6 peuvent développer une arthrose liée au vieillissement dès 15 mois de vie (Wilhelmi et Faust., 1976). Une étude récente montre même l'apparition précoce, dès 12 mois de vie, d'atteinte arthrosique du cartilage (Butterfield et al., 2021).

Les résultats obtenus sur notre modèle d'arthrose spontanée de souris haploinsuffisantes en MGP indiquent que parmi les souris WT étudiées, un seul individu présente un début de lésions articulaires à 18 mois de vie.

En effet, nos analyses histologiques n'ont pas mis en évidence de différences entre les souris WT et hétérozygotes pour le gène codant MGP. Ce résultat indique que MGP ne semble pas jouer un rôle majeur dans le développement de l'arthrose. Cependant, le faible nombre d'individus hétérozygotes étudiés et l'impossibilité de développer des modèles d'arthrose liée au vieillissement chez nos souris MGP KO du fait de leur létalité précoce ne permettent pas de conclure de manière définitive quant au rôle de MGP dans la survenue de lésions articulaires.

Nous sommes parfaitement conscients que le nombre d'individus étudiés n'est pas suffisant pour conclure sur le rôle de MGP dans le développement de l'arthrose. Ce faible nombre d'individus est principalement dû à la pandémie de COVID-19 qui a empêché la mise en place d'accouplements au sein de l'animalerie du laboratoire IMoPA de Mars à Juillet 2020. De plus, le stade 18 mois est un stade relativement avancé dans la vie des souris, ce qui a entraîné de nombreuses pertes par rapport au nombre d'individus initialement mis en vieillissement. D'autres animaux sont en cours de vieillissement afin d'atteindre un nombre d'individus suffisants pour évaluer l'impact de l'haploinsuffisance en MGP sur le développement de l'arthrose.

Par ailleurs, nous disposons également de plusieurs échantillons de genoux de souris WT et hétérozygotes à des stades de vieillissement plus avancés, plus précisément à 20 et 24 mois de vie dont l'analyse est en cours.

De même, pour compléter nos premiers résultats et ceux que nous obtiendrons sur ces derniers stades, afin d'étudier plus précisément la dégradation du cartilage et surtout la formation d'ostéophytes, nous avons prévu de réaliser des immunomarquages du collagène de type II en utilisant le même protocole que pour l'étude de la plaque de croissance des souris MGP KO.

Nous avons également prévu d'utiliser des modèles murins d'arthrose traumatique. Pour mettre en place de tels modèles, nous souhaitons réaliser des opérations chirurgicales de déstabilisation du ménisque médian (DMM) sur des souris WT et hétérozygotes pour le gène codant MGP. Notre choix s'est arrêté sur le modèle d'arthrose induite par DMM du fait qu'il s'agisse aujourd'hui du modèle le plus largement répandu au sein de la communauté scientifique. Il s'agit d'un modèle proche de la pathologie humaine, qui est caractérisé par une progression lente, des atteintes articulaires peu sévères ainsi qu'une composante inflammatoire moindre (McNulty et al., 2011, 2012). De plus, il s'agit d'une approche expérimentale qui est maîtrisée par plusieurs membres de notre équipe de recherche.

Il est toutefois important de noter que nous n'avons jamais observé de différences de phénotype squelettique entre les souris hétérozygotes pour le gène codant MGP et les souris WT. Il est alors possible que l'haploinsuffisance en MGP ne soit pas suffisante pour avoir un impact sur le développement de l'arthrose. De plus, il nous est impossible de mettre en place des modèles d'arthrose, même traumatiques sur les souris MGP KO, du fait de leur courte espérance de vie (entre 6 et 8 semaines de vie) qui est liée à leur phénotype vasculaire. Nous pourrions cependant envisager d'utiliser des modèles de souris déficientes en MGP dont le phénotype vasculaire a été compensé comme les souris *Mgp*<sup>-/-</sup> ; *SM22-Mgp* ou *Mgp*<sup>-/-</sup> ; *Eln*<sup>+/-</sup> qui ne présentent pas de létalité précoce (Murshed et al., 2004 ; Marulanda et al., 2013). Notre équipe de recherche fait également partie d'un projet international qui vise à générer de nouvelles lignées de souris présentant des mutations spécifiques au niveau des résidus Gla et/ou des résidus sérines phosphorylés. Il serait alors intéressant d'étudier le développement d'arthrose induite et spontanée dans ces nouvelles lignées de souris mutées au niveau du gène codant MGP. En effet, l'utilisation de ces nouvelles lignées permettrait de mettre en évidence le rôle des modifications post-traductionnelles de MGP dans la régulation du cartilage articulaire de manière équivalente à la récente étude menée au niveau vasculaire (Parashar et al., 2022).



# Discussion générale & Perspectives



La protéine matricielle Gla est un membre de la famille des protéines vitamine K-dépendantes qui est principalement connue pour son rôle d'inhibiteur de la minéralisation. Chez l'Homme, des mutations du gène codant MGP sont associées à une maladie génétique, nommée syndrome de Keutel, qui est caractérisée par l'apparition de calcifications artérielles, de problèmes respiratoires et de dysplasies squelettiques (cf. partie 2.2 de l'introduction). De plus, le modèle murin de la déficience en MGP (cf. partie 2.3 de l'introduction), les souris MGP KO, reproduit de manière exacerbée les phénotypes squelettique, respiratoire et vasculaire des patients Keutel. A l'aide de ce modèle animal, plusieurs études, dont certaines conduites au sein de notre laboratoire, ont démontré le rôle de MGP dans l'inhibition des calcifications artérielles et trachéo-bronchiques. Cependant, le rôle de MGP dans le développement du squelette, plus particulièrement au niveau de la plaque de croissance et du cartilage articulaire, reste mal caractérisé.

C'est dans ce contexte que mon sujet de thèse s'est proposé, pour la toute première fois, en combinant des approches *in vivo* et *in vitro*, de décrire le phénotype de la plaque de croissance des souris MGP KO et de tenter d'identifier les mécanismes moléculaires qui sont responsables de sa mise en place.

Premièrement, par des études *in vivo*, j'ai confirmé la mise en place d'un retard de croissance modéré chez les souris MGP KO à partir de 21 jours de vie post-natale. De plus, grâce à des mesures des éléments de la plaque de croissance, j'ai constaté une diminution de l'épaisseur totale de croissance à partir de P21, ainsi qu'une réduction de la zone hypertrophique qui apparaît rapidement au cours du développement post-natal. En plus des atteintes de la plaque de croissance, j'ai également observé une altération des premières étapes de la formation des centres d'ossification secondaires en absence de MGP.

Chez les souris déficientes en MGP, nous observons également une altération du processus d'autophagie à la fin de la première semaine de vie post-natale. De plus, la mise en place du retard de croissance chez les souris MGP KO est également associée à des variations d'expressions complexes de gènes impliqués dans la voie des BMPs, des FGFs, la signalisation Hedgehog et la formation du cil primaire.

Deuxièmement, avec l'objectif de mieux caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans l'apparition de ces retards de croissance, j'ai réalisé de expériences *in vitro* de

modulation du phénotype chondrocytaire par la signalisation par les FGFs et les BMPs dans les cellules issues de souris WT et MGP KO. Dans ces différentes conditions, j'ai d'abord observé des différences d'expressions de gènes en conditions de culture standards dans les chondrocytes MGP KO, avec une diminution de l'expression des gènes codant pour le collagène de type X ou FGFR3 et au contraire une augmentation d'expression des gènes cibles de BMP2. L'effet des différentes stimulations ne semble pas différer entre les cellules MGP KO par rapport aux contrôles. Cependant, si la nature de la réponse ne varie pas entre les deux génotypes, celle-ci est généralement plus marquée dans les chondrocytes n'exprimant pas MGP. De plus, nous avons constaté une tendance à la diminution des niveaux protéiques des acteurs de l'autophagie en cas de déficience en MGP, ce qui entre en contradiction avec les résultats *in vivo* qui montrent une accumulation de LC3B au niveau des chondrocytes hypertrophiques MGP KO.

Troisièmement, en parallèle de l'étude de l'impact de la déficience en MGP, j'ai étudié l'impact de l'haploinsuffisance en MGP sur le développement d'arthrose lors du vieillissement. Cependant, du fait des faibles signes d'arthrose visibles au stade de vieillissement le plus avancé que nous avons analysé (18 mois) et du nombre limité d'individus étudiés, il ne m'est pas possible de conclure de manière certaine sur le rôle de l'haploinsuffisance en MGP dans le développement de l'arthrose.

Les résultats que j'ai obtenus au cours de mes trois années de thèse constituent la première caractérisation du rôle de MGP dans l'apparition de retard de croissance et plus généralement dans le développement post-natal de la plaque de croissance murine.

En termes de perspectives à court ou moyen terme, des études complémentaires devront être réalisées afin de compléter mes résultats de thèse concernant l'impact de la déficience en MGP sur la signalisation par FGFR3, la voie des BMPs, le cil primaire et le processus d'autophagie.

De même, pour des perspectives à court/moyen terme vis-à-vis du rôle de MGP dans le développement de l'arthrose, nous sommes en train de réaliser des expériences sur des stades plus avancés rassemblant un plus grand nombre d'échantillons de genoux murins à ce stade qui seront obtenus très prochainement. Le développement de modèles d'arthrose spontanée ou induite sur de nouvelles lignées de souris déficientes en MGP pourrait préciser si MGP joue

un rôle dans différents types d'arthroses ainsi que l'implication respective des modifications post-traductionnelles dans la régulation du cartilage articulaire.

Mon travail de thèse a rencontré des limitations, des obstacles ou des défis qui m'ont amené à me poser de nombreuses questions sur le choix des modèles animaux et cellulaires utilisés ainsi que les approches expérimentales utilisées. J'ai souhaité développer ces questions sous une forme d'auto-critique du travail réalisé durant ces 3 années passées au laboratoire IMoPA.

### **Etude d'un phénotype modéré : un défi de taille ?**

La majorité des expériences que j'ai réalisées au cours de ma thèse, que cela soit *in vivo* ou *in vitro*, sont des expériences qui sont largement utilisées par la communauté scientifique pour comparer des échantillons WT et mutés pour un gène d'intérêt (que cela soit un modèle KO total ou conditionnel). Cependant, si ces expériences sont bien adaptées pour étudier et comparer des phénotypes sévères (comme celui des souris achondroplasiques), la divergence entre mes résultats *in vivo* et *in vitro* m'a fait réaliser que cela est plus complexe dans le cas de phénotypes modérés comme celui des souris MGP KO. A titre personnel et rétrospectivement, je pense que l'utilisation de techniques plus avancées, notamment de transcriptomiques et de protéomiques nous aurait peut-être permis de mieux discriminer les acteurs moléculaires qui sont impliqués dans le retard de croissance des souris MGP KO (malgré leurs coûts relativement élevés). Les techniques plus classiques et moins coûteuses ne seraient alors utilisées qu'après criblages des gènes/protéines présentant le plus de différences entre les deux groupes d'individus.

### **Les souris MGP KO : le modèle murin le plus approprié pour étudier le rôle de MGP dans la plaque de croissance ?**

Tout d'abord des modèles animaux exprimant MGP sous une forme (partiellement) inactive seraient plus proches de la pathologie humaine que les modèles MGP KO, qui n'expriment aucunement le gène *Mgp* dans leur génome. En effet, rappelons que les mutations du gène MGP responsables de l'apparition du syndrome de Keutel aboutissent à des formes tronquées de la protéine qui sont suspectées de posséder, au moins pour certains patients, une activité

résiduelle. Cette activité résiduelle pourrait expliquer le fait que les patients Keutel ne développent pas de calcifications artérielles extensives et que leur espérance de vie n'est pas atteinte, au contraire de nos souris MGP KO.

De manière connexe, l'utilisation de modèles murins ne présentant pas de phénotype vasculaire léthal, nous permettrait d'étudier le développement squelettique sur des temps plus longs. De plus, d'un point de vue éthique, l'absence de létalité précoce des souris mutées nous permettrait de réduire considérablement le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir un nombre suffisant d'échantillons.

### **Les souris MGP KO : le modèle murin le plus approprié pour étudier le rôle de MGP dans l'arthrose ?**

Comme indiqué dans les parties de ce manuscrit dédiées à l'arthrose (partie 4 de l'introduction et partie 3 des résultats), le modèle de souris MGP KO n'était absolument pas une option possible pour l'étude de cette pathologie. En effet, la faible espérance de vie des souris MGP KO (entre 6 et 8 semaines de vie) exclut toute possibilité de mettre en place des modèles de vieillissement. De même les modèles d'arthrose traumatique comme la déstabilisation du ménisque médian impliquent une opération chirurgicale à 10 semaines de vie, ce qui n'est encore une fois pas possible avec les souris MGP KO. Nous avons donc porté notre choix sur les souris hétérozygotes pour le gène codant MGP, qui par ailleurs ont toujours été décrites comme ayant un phénotype équivalent à ceux des souris WT. Il est donc très hypothétique qu'elles présentent des différences significatives dans le développement d'arthroses spontanées ou induites. L'utilisation de souris déficientes en MGP chez lesquelles le phénotype vasculaire est compensé m'apparaît alors comme beaucoup plus pertinent. En premier lieu, nous pourrions utiliser les *Mgp*<sup>-/-</sup> ; *SM22-Mgp*, même en tenant compte du fait que ces souris ne développent pas tout à fait le même phénotype squelettique que les souris MGP KO, notamment en ce qui concerne l'ostéopénie. Plus judicieusement, l'utilisation des nouvelles lignées de souris qui présentent des formes mutées de MGP au niveau de ses résidus Gla ou de ses résidus sérine phosphorylés serait intéressante pour l'étude de l'arthrose si ces dernières ne présentent pas de phénotype vasculaire léthal.

### **Etude *in vitro* : une extrapolation *in vivo* difficile ?**

Les cultures primaires de chondrocytes issus de la digestion enzymatique de cartilage de la tête fémorale ou de cartilage costal constituent l'un des modèles les plus utilisés par la communauté scientifique. Ce type de culture permet d'obtenir des monocouches de chondrocytes prolifératifs qui ne possèdent par conséquent pas les propriétés de s'arranger en colonnes, de subir de maturation ou d'être soumis à un environnement hypoxique et pauvre en nutriments comme c'est le cas au sein de la plaque de croissance. L'extrapolation de la comparaison de résultats obtenus dans ce modèle cellulaire avec ceux obtenus *in vivo* sur des plaques de croissance d'os longs murins est souvent difficile à réaliser et peut même être problématique dans certains cas. La culture et la différenciation de micro-masses de cellules mésenchymateuses ou la mise en culture d'explants de cartilage de croissance pourraient être des alternatives intéressantes au modèle actuellement utilisé par l'équipe.

### **Le faible nombre de cas cliniques de patients Keutel : un frein à l'étude de MGP ?**

Comme indiqué dans la partie 2.2 de l'introduction, le syndrome de Keutel est une maladie autosomale récessive extrêmement rare (prévalence estimée < à 1/1 000 000) avec seulement 43 cas cliniques identifiés dans la littérature. Le nombre de patients et de données cliniques disponibles restent largement insuffisants. Il nous est ainsi difficile pour ne pas dire impossible, d'avoir accès à des échantillons de patients, sur lesquels il serait pourtant intéressant de réaliser des études de transcriptomique/protéomique. Il serait également intéressant de mettre en culture des chondrocytes issus de ces patients et de réaliser des expériences analogues à celles effectuées lors de ma thèse. De plus, du fait de la grande variabilité des signes cliniques présentés par les patients Keutel, certains d'entre eux n'ont pas été étudiés et décrits chez les 43 patients. A titre d'exemple, aucune donnée clinique n'est disponible concernant la mise en place de retard de croissance chez 12 de ces patients, ce qui ne permet pas une estimation correcte de la prévalence de ce signe clinique chez l'Homme. De même, si quelques études sur des patients Keutel plus âgés ont permis de mettre en évidence l'effet du vieillissement sur le développement de calcifications cutanées et d'alopécie, il n'existe à ce jour aucunes données cliniques concernant le développement d'arthrose chez ces patients. Au sein de l'équipe, nous pensons qu'un meilleur accès à des

échantillons de patients Keutel et une comparaison avec les résultats obtenus sur nos modèles murins et cellulaires (en tenant compte de leurs limitations respectives) pourraient permettre de mieux caractériser le rôle de MGP. Des recherches récentes dans la banque de données française des maladies rares ont permis d'identifier 5 patients Keutel potentiels. Une demande auprès des cliniciens en charge de ces patients est en cours pour avoir accès aux données cliniques de ces patients.

### **Déficiences en MGP et brachytéléphalangisme : une particularité humaine ?**

Le retard de croissance est un signe clinique qui n'a été décrit que chez 25% des patients Keutel alors que le brachytéléphalangisme et le dysmorphisme crânio-facial sont présents chez la majorité d'entre eux (Cancela et al., 2021). Si l'hypoplasie médio-faciale a déjà été décrite et étudiée par nos collaborateurs de l'Université de McGill (Montréal, Canada) (Marulanda et al., 2017), aucune étude n'a été menée concernant l'atteinte des phalanges en cas de déficience en MGP. Au cours de nos analyses histo-morphométriques des squelettes complets de souris, nous n'avons pas observé de modifications particulières des phalanges des souris MGP KO. Cependant, du fait que de nombreuses dysplasies squelettiques qui impliquent des retards de croissance soient associées à de la brachydactylie, signe clinique proche du brachytéléphalangisme, et qu'il s'agisse d'un signe clinique majeur des patients Keutel, il m'apparaît comme nécessaire d'approfondir son étude sur les souris MGP KO.

### **La sévérité des phénotypes humains et animaux conditionne t'elle l'importance d'une protéine ?**

Comme indiqué auparavant, des mutations perte-de-fonction chez l'Homme, voire une absence totale dans le génome murin du gène codant pour MGP n'entraînent pas l'apparition de dysplasies squelettiques sévères. De même, au contraire d'une autre protéine de la même famille, l'ostéocalcine (BGP), MGP est une protéine qui est de manière générale peu citée ou étudiée lorsque des études sont menées sur le développement squelettique. Ceci alors qu'il est connu depuis la première description du modèle MGP KO il y a 25 ans, que cette protéine joue un rôle dans le processus d'ossification endochondrale.

Au sein de notre équipe de recherche nous pensons au contraire que l'étude de MGP est importante pour comprendre les mécanismes impliqués dans le développement squelettique post-natal.

Il est en effet probable que cette protéine joue un rôle, au moins partiel, dans le développement de nombreuses dysplasies squelettiques en plus de celui qu'elle joue dans le syndrome de Keutel. Mais le manque de données concernant MGP et le développement squelettique reste un véritable frein à la compréhension de son rôle au sein de ce processus complexe, qui pourrait pourtant ouvrir la voie vers de nouvelles pistes thérapeutiques.

En conclusion, les travaux réalisés au cours de ces trois années de thèse ont permis de mettre en évidence l'impact de la déficience en MGP sur la plaque de croissance et les acteurs moléculaires impliqués dans sa régulation. Ces premiers résultats constituent ainsi les fondations sur lesquelles reposeront les prochaines approches expérimentales de l'équipe, qui permettront une meilleure compréhension du rôle que tient MGP dans le développement du cartilage sain et pathologique.



# Références Bibliographiques



- Abbott, A., Sibert, J., & Weaver, J. (1977). Chondrodysplasia punctata and maternal warfarin treatment. *British Medical Journal*, *1*(6077), 1639.
- Abubakar, A. A., Ali, A. K., Ibrahim, S. M., Handool, K. O., Khan, M. S., Mustapha, N. M., Ibrahim, T. A. T., Kaka, U., & Yusof, L. M. (2022). Roles of Sodium Hydrogen Exchanger (NHE1) and Anion Exchanger (AE2) across Chondrocytes Plasma Membrane during Longitudinal Bone Growth. *Membranes*, *12*(7), 707.
- Acar, G., Yilmaz, M., Sekercioğlu, N., & Yüksel, A. (2010). Keutel syndrome in a patient presenting with hearing loss. *B-ENT*, *6*(3), 201-204. PubMed.
- Adams, C. S., & Shapiro, I. M. (2002). The fate of the terminally differentiated chondrocyte: evidence for microenvironmental regulation of chondrocyte apoptosis. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, *13*(6), 465-473.
- Adams, S. L., Pallante, K. M., Niu, Z., Cohen, A. J., Lu, J., & LeBoy, P. S. (2003). Stimulation of type-X collagen gene transcription by retinoids occurs in part through the BMP signaling pathway. *JBJS*, *85*(suppl\_3), 29-33.
- Aghajanian, P., & Mohan, S. (2018). The art of building bone: emerging role of chondrocyte-to-osteoblast transdifferentiation in endochondral ossification. *Bone Research*, *6*(1), 19.
- Aghajanian, P., Xing, W., Cheng, S., & Mohan, S. (2017). Epiphyseal bone formation occurs via thyroid hormone regulation of chondrocyte to osteoblast transdifferentiation. *Scientific Reports* *7*, 10432.
- Aikawa, T., Segre, G. V., & Lee, K. (2001). Fibroblast growth factor inhibits chondrocytic growth through induction of p21 and subsequent inactivation of cyclin E-Cdk2. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(31), 29347-29352.
- Akiyama, H., Chaboissier, M.-C., Behringer, R. R., Rowitch, D. H., Schedl, A., Epstein, J. A., & De Crombrughe, B. (2004). Essential role of Sox9 in the pathway that controls formation of cardiac valves and septa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(17), 6502-6507.
- Akiyama, H., Chaboissier, M.-C., Martin, J. F., Schedl, A., & de Crombrughe, B. (2002). The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes & development*, *16*(21), 2813-2828.
- Al-Gazali, L. I., Varghese, M., Varady, E., Al Talabani, J., Scorer, J., & Bakalinova, D. (1996). Neonatal Schwartz-Jampel syndrome: a common autosomal recessive syndrome in the United Arab Emirates. *Journal of Medical Genetics*, *33*(3), 203.
- Ali, B. R., Xu, H., Akawi, N. A., John, A., Karuvantevida, N. S., Langer, R., Al-Gazali, L., & Leitinger, B. (2010). Trafficking defects and loss of ligand binding are the underlying causes of all reported DDR2 missense mutations found in SMED-SL patients. *Human molecular genetics*, *19*(11), 2239-2250.
- Almubarak, A., Lavy, R., Srmic, N., Hu, Y., Maripuri, D. P., Kume, T., & Berry, F. B. (2021). Loss of Foxc1 and Foxc2 function in chondroprogenitor cells disrupts endochondral ossification. *Journal of Biological Chemistry*, *297*(3).
- Alonso, N., Meinitzer, A., Fritz-Petrin, E., Enko, D., & Herrmann, M. (2022). Role of Vitamin K in Bone and Muscle Metabolism. *Calcified Tissue International*, [10.1007/s00223-022-00955-3](https://doi.org/10.1007/s00223-022-00955-3).
- Arbolea, L., & Castañeda, S. (2013). Osteoimmunology: the study of the relationship between the immune system and bone tissue. *Reumatología Clínica (English Edition)*, *9*(5), 303-315.
- Arndt, V., Dick, N., Tawo, R., Dreiseidler, M., Wenzel, D., Hesse, M., Fürst, D. O., Saftig, P., Saint, R., & Fleischmann, B. K. (2010). Chaperone-assisted selective autophagy is essential for muscle maintenance. *Current Biology*, *20*(2), 143-148.
- Arnold, M. A., Kim, Y., Czubryt, M. P., Phan, D., McAnally, J., Qi, X., Shelton, J. M., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2007a). MEF2C Transcription Factor Controls Chondrocyte Hypertrophy and Bone Development. *Developmental Cell*, *12*(3), 377-389.
- Atlashkin, V., Kreykenbohm, V., Eskelinen, E.-L., Wenzel, D., Fayyazi, A., & Fischer von Mollard, G. (2003). Deletion of the SNARE vti1b in mice results in the loss of a single SNARE partner, syntaxin 8. *Molecular and cellular biology*, *23*(15), 5198-5207.
- Aubourg, G., Rice, S. J., Bruce-Wootton, P., & Loughlin, J. (2022). Genetics of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, *30*(5), 636-649.
- Augstein, A., Mierke, J., Poitz, D. M., & Strasser, R. H. (2018). Sox9 is increased in arterial plaque and stenosis, associated with synthetic phenotype of vascular smooth muscle cells and causes alterations in extracellular matrix and calcification. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1864*(8), 2526-2537.
- Avasthi, P., & Marshall, W. F. (2012). Stages of ciliogenesis and regulation of ciliary length. *Differentiation*, *83*(2), S30-S42.
- Ayyildiz, P., Bilgici, M. C., Ozyilmaz, B., Sungur, M., Baysal, K., & Ogur, G. (s. d.). Keutel Syndrome: A Case Report With Aortic Calcification, *17*(3), 167 - 169.
- Ballal, P., Peloquin, C., Boer, C. G., & Neogi, T. (2021). Warfarin use and risk of knee and hip replacements. *Annals of the rheumatic diseases*, *80*(5), 605-609.

- Barbosa-Buck, C. O., Orioli, I. M., da Graça Dutra, M., Lopez-Camelo, J., Castilla, E. E., & Cavalcanti, D. P. (2012). Clinical epidemiology of skeletal dysplasias in South America. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 158(5), 1038-1045.
- Barr, L., Getgood, A., Guehring, H., Rushton, N., & Henson, F. M. (2014). The effect of recombinant human fibroblast growth factor-18 on articular cartilage following single impact load. *Journal of Orthopaedic Research*, 32(7), 923-927.
- Bartolomeo, R., Cinque, L., De Leonibus, C., Forrester, A., Salzano, A. C., Monfregola, J., De Gennaro, E., Nusco, E., Azario, I., Lanzara, C., Serafini, M., Levine, B., Ballabio, A., & Settembre, C. (2017). mTORC1 hyperactivation arrests bone growth in lysosomal storage disorders by suppressing autophagy. *Journal of Clinical Investigation*, 127(10), 3717-3729.
- Bassett, J. D., Williams, A. J., Murphy, E., Boyde, A., Howell, P. G., Swinhoe, R., Archanco, M., Flamant, F., Samarut, J., & CostaGliola, S. (2008). A lack of thyroid hormones rather than excess thyrotropin causes abnormal skeletal development in hypothyroidism. *Molecular endocrinology*, 22(2), 501-512.
- Baujat, G., Legeai-Mallet, L., Finidori, G., Cormier-Daire, V., & Le Merrer, M. (2008a). Achondroplasia. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 22(1), 3-18.
- Bellus, G. A., Spector, E. B., Speiser, P. W., Weaver, C. A., Garber, A. T., Bryke, C. R., Israel, J., Rosengren, S. S., Webster, M. K., & Donoghue, D. J. (2000). Distinct missense mutations of the FGFR3 lys650 codon modulate receptor kinase activation and the severity of the skeletal dysplasia phenotype. *The American Journal of Human Genetics*, 67(6), 1411-1421.
- Berendsen, A. D., & Olsen, B. R. (2014). How Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF) Regulates Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 62(2), 103-108.
- Berendsen, A. D., & Olsen, B. R. (2015). Bone development. *Bone*, 80, 14-18.
- Beulens, J. W. J., Booth, S. L., van den Heuvel, E. G. H. M., Stoecklin, E., Baka, A., & Vermeer, C. (2013). The role of menaquinones (vitamin K2) in human health. *British Journal of Nutrition*, 110(8), 1357-1368. Cambridge Core.
- Bi, W., Huang, W., Whitworth, D. J., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R., & De Crombrugge, B. (2001). Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(12), 6698-6703.
- Bijlsma, J. W., Berenbaum, F., & Lafeber, F. P. (2011). Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *The Lancet*, 377(9783), 2115-2126.
- Bing, W., & Feng, L. (2015). Attenuate synovial fluid uncarboxylated matrix Gla-protein (ucMGP) concentrations are linked with radiographic progression in knee psteoarthritis. *Adv Clin Exp Med*, 24(6), 1013.
- Biosse Duplan, M., Dambroise, E., Estibals, V., Veziers, J., Guicheux, J., & Legeai-Mallet, L. (2021). An Fgfr3-activating mutation in immature murine osteoblasts affects the appendicular and craniofacial skeleton. *Disease Models & Mechanisms*, 14(4), dmm048272.
- Blair, H. J., Tompson, S., Liu, Y.-N., Campbell, J., MacArthur, K., Ponting, C. P., Ruiz-Perez, V. L., & Goodship, J. A. (2011). Evc2 is a positive modulator of Hedgehog signalling that interacts with Evc at the cilia membrane and is also found in the nucleus. *BMC biology*, 9(1), 1-13.
- Blumer, M. J. F. (2021). Bone tissue and histological and molecular events during development of the long bones. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 235, 151704.
- Bober, M. B., Bellus, G. A., Nikkel, S. M., & Tiller, G. E. (2020). Hypochondroplasia. *GeneReviews*<sup>®</sup>[Internet].
- Boer, C. G., Szilagyi, I., Nguyen, N. L., Neogi, T., Meulenbelt, I., Ikram, M. A., Uitterlinden, A. G., Bierma-Zeinstra, S., Stricker, B. H., & Van Meurs, J. B. (2021). Vitamin K antagonist anticoagulant usage is associated with increased incidence and progression of osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 80(5), 598-604.
- Bohensky, J., Shapiro, I. M., Leshinsky, S., Terkhorn, S. P., Adams, C. S., & Srinivas, V. (2007). HIF-1 regulation of chondrocyte apoptosis: induction of the autophagic pathway. *Autophagy*, 3(3), 207-214.
- Bonaventure, J., Rousseau, F., Legeai-Mallet, L., Le Merrer, M., Munnich, A., & Maroteaux, P. (1996). Common mutations in the fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) gene account for achondroplasia, hypochondroplasia, and thanatophoric dwarfism. *American journal of medical genetics*, 63(1), 148-154.
- Bonucci, E., Cuicchio, M., & Dearden, L. (1974). Investigations of ageing in costal and tracheal cartilage of rats. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 147(4), 505-527.
- Bonyadi Rad, E., Musumeci, G., Pichler, K., Heidary, M., Szychlinska, M. A., Castrogiovanni, P., Marth, E., Böhm, C., Srinivasaiah, S., & Krönke, G. (2017). Runx2 mediated induction of novel targets ST2 and Runx3 leads to cooperative regulation of hypertrophic differentiation in ATDC5 chondrocytes. *Scientific reports*, 7(1), 1-17.
- Borochowitz, Z., Langer Jr, L. O., Gruber, H. E., Lachman, R., Katznelson, M. B., & Rimoin, D. L. (1993). Spondylo-meta-epiphyseal dysplasia (SMED), short limb-hand type: A congenital familial skeletal dysplasia with distinctive features and histopathology. *American journal of medical genetics*, 45(3), 320-326.

- Bosemani, T., Felling, R. J., Wyse, E., Pearl, M. S., Tekes, A., Ahn, E., Poretti, A., & Huisman, T. A. G. M. (2014). Neuroimaging findings in children with Keutel syndrome. *Pediatric Radiology*, *44*(1), 73-78.
- Boström, K., Tsao, D., Shen, S., Wang, Y., & Demer, L. L. (2001). Matrix GLA Protein Modulates Differentiation Induced by Bone Morphogenetic Protein-2 in C3H10T1/2 Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(17), 14044-14052.
- Boström, K., Watson, K. E., Horn, S., Wortham, C., Herman, I. M., & Demer, L. L. (1993). Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *Journal of Clinical Investigation*, *91*(4), 1800-1809.
- Bouderlique, T., Vuppalapati, K. K., Newton, P. T., Li, L., Barenus, B., & Chagin, A. S. (2016). Targeted deletion of Atg5 in chondrocytes promotes age-related osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *75*(3), 627-631.
- Bouderlique, T., Vuppalapati, K., Newton, P., Li, L., Barenus, B., Ponzer, S., & Chagin, A. (2015). Autophagy and osteoarthritis development. *Osteoarthritis and Cartilage*, *23*, A309.
- Briggs, M. D., Brock, J., Ramsden, S. C., & Bell, P. A. (2014). Genotype to phenotype correlations in cartilage oligomeric matrix protein associated chondrodysplasias. *European Journal of Human Genetics*, *22*(11), 1278-1282.
- Briggs, M. D., & Chapman, K. L. (2002). Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia: mutation review, molecular interactions, and genotype to phenotype correlations. *Human mutation*, *19*(5), 465-478.
- Briggs, M. D., & Wright, M. J. (2018). Pseudoachondroplasia. *GeneReviews*<sup>®</sup>[Internet].
- Bronckers, A. L. J. J., Price, P. A., Schrijvers, A., Bervoets, T. J. M., & Karsenty, G. (1998). Studies of osteocalcin function in dentin formation in rodent teeth. *European Journal of Oral Sciences*, *106*(3), 795-807.
- Buchtova, M., Oralova, V., Aklia, A., Masek, J., Vesela, I., Ouyang, Z., Obadalova, T., Konecna, Z., Spoustova, T., & Pospisilova, T. (2015). Fibroblast growth factor and canonical WNT/ $\beta$ -catenin signaling cooperate in suppression of chondrocyte differentiation in experimental models of FGFR signaling in cartilage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, *1852*(5), 839-850.
- Buckwalter, J. A., Mankin, H. J., & Grodzinsky, A. J. (2005). Articular cartilage and osteoarthritis. *Instructional Course Lectures-American Academy of Orthopaedic Surgeons*, *54*, 465.
- Burman, C., & Ktistakis, N. T. (2010). *Autophagosome formation in mammalian cells*. *32*, 397-413.
- Butterfield, N. C., Curry, K. F., Steinberg, J., Dewhurst, H., Komla-Ebri, D., Mannan, N. S., Adoum, A.-T., Leitch, V. D., Logan, J. G., & Waung, J. A. (2021). Accelerating functional gene discovery in osteoarthritis. *Nature communications*, *12*(1), 1-18.
- Caramés, B., Hasegawa, A., Taniguchi, N., Miyaki, S., Blanco, F. J., & Lotz, M. (2012). Autophagy activation by rapamycin reduces severity of experimental osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, *71*(4), 575-581.
- Caminos, J. E., Gualillo, O., Lago, F., Otero, M., Blanco, M., Gallego, R., Garcia-Caballero, T., Goldring, M. B., Casanueva, F. F., Gomez-Reino, J. J., & Dieguez, C. (2005). The Endogenous Growth Hormone Secretagogue (Ghrelin) Is Synthesized and Secreted by Chondrocytes. *Endocrinology*, *146*(3), 1285-1292.
- Cancela, L., Hsieh, C. L., Francke, U., & Price, P. A. (1990). Molecular structure, chromosome assignment, and promoter organization of the human matrix Gla protein gene. *Journal of Biological Chemistry*, *265*(25), 15040-15048.
- Cancela, M. L., Hu, B., & Price, P. A. (1997). Effect of cell density and growth factors on matrix GLA protein expression by normal rat kidney cells. *Journal of Cellular Physiology*, *171*(2), 125-134.
- Cancela, M. L., Laizé, V., & Conceição, N. (2014). Matrix Gla protein and osteocalcin: From gene duplication to neofunctionalization. *Bone: A dynamic and integrating tissue*, *56*(1), 56-63.
- Cancela, M. L., Laizé, V., Conceição, N., Kempf, H., & Murshed, M. (2021). Keutel Syndrome, a Review of 50 Years of Literature. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*.
- Cancela, M. L., Ohresser, M. C. P., Reia, J. P., Viegas, C. S. B., Williamson, M. K., & Price, P. A. (2001). Matrix Gla Protein in *Xenopus laevis*: Molecular Cloning, Tissue Distribution, and Evolutionary Considerations\*. *Journal of Bone and Mineral Research*, *16*(9), 1611-1621.
- Cancela, M. L., & Price, P. A. (1992). Retinoic acid induces matrix Gla protein gene expression in human cells. *Endocrinology*, *130*(1), 102-108.
- Caramés, B., Taniguchi, N., Otsuki, S., Blanco, F. J., & Lotz, M. (2010). Autophagy is a protective mechanism in normal cartilage, and its aging-related loss is linked with cell death and osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, *62*(3), 791-801.
- Cario-Toumaniantz, C., Boularan, C., Schurgers, L. J., Heymann, M.-F., Le Cunff, M., Léger, J., Loirand, G., & Pacaud, P. (2007). Identification of Differentially Expressed Genes in Human Varicose Veins: Involvement of Matrix Gla Protein in Extracellular Matrix Remodeling. *Journal of Vascular Research*, *44*(6), 444-459.
- Caron, M. M. J., Emans, P. J., Cremers, A., Surtel, D. A. M., Coolen, M. M. E., van Rhijn, L. W., & Welting, T. J. M. (2013). Hypertrophic differentiation during chondrogenic differentiation of progenitor cells is stimulated by BMP-2 but suppressed by BMP-7. *Osteoarthritis and Cartilage*, *21*(4), 604-613.
- Carra, S., Seguin, S. J., & Landry, J. (2008). HspB8 and Bag3: a new chaperone complex targeting misfolded proteins to macroautophagy. *Autophagy*, *4*(2), 237-239.

- Cavaco, S., Viegas, C. S. B., Rafael, M. S., Ramos, A., Magalhães, J., Blanco, F. J., Vermeer, C., & Simes, D. C. (2016). Gla-rich protein is involved in the cross-talk between calcification and inflammation in osteoarthritis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(5), 1051-1065.
- Chagin, A. S., Karimian, E., Sundström, K., Eriksson, E., & Sävendahl, L. (2010). Catch-up growth after dexamethasone withdrawal occurs in cultured postnatal rat metatarsal bones. *Journal of Endocrinology*, 204(1), 21-29.
- Chang, C.-F., Ramaswamy, G., & Serra, R. (2012). Depletion of primary cilia in articular chondrocytes results in reduced Gli3 repressor to activator ratio, increased Hedgehog signaling, and symptoms of early osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 20(2), 152-161.
- Chen, F. H., Rousche, K. T., & Tuan, R. S. (2006). Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. *Nature clinical practice rheumatology*, 2(7), 373-382.
- Chen, H. (Éd.). (2012). Hypochondroplasia. In *Atlas of Genetic Diagnosis and Counseling* (p. 1105-1112). Springer US.
- Chen, L., Adar, R., Yang, X., Monsonego, E. O., Li, C., Hauschka, P. V., Yayon, A., & Deng, C.-X. (1999). Gly369Cys mutation in mouse FGFR3 causes achondroplasia by affecting both chondrogenesis and osteogenesis. *The Journal of clinical investigation*, 104(11), 1517-1525.
- Chen, L., Li, C., Qiao, W., Xu, X., & Deng, C. (2001). A Ser365→Cys mutation of fibroblast growth factor receptor 3 in mouse downregulates Ihh/PTHrP signals and causes severe achondroplasia. *Human molecular genetics*, 10(5), 457-466.
- Chen, M., Zhu, M., Awad, H., Li, T.-F., Sheu, T.-J., Boyce, B. F., Chen, D., & O'Keefe, R. J. (2008). Inhibition of  $\beta$ -catenin signaling causes defects in postnatal cartilage development. *Journal of cell science*, 121(9), 1455-1465.
- Chen, Y., & Klionsky, D. J. (2011). The regulation of autophagy—unanswered questions. *Journal of cell science*, 124(2), 161-170.
- Cheng, S. Y., & Bishop, J. M. (2002). Suppressor of Fused represses Gli-mediated transcription by recruiting the SAP18-mSin3 corepressor complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(8), 5442-5447.
- Chiang, H.-L., Terlecky, S. R., Plant, C. P., & Dice, J. F. (1989). A Role for a 70-Kilodalton Heat Shock Protein in Lysosomal Degradation of Intracellular Proteins. *Science*, 246(4928), 382-385.
- Chin, K.-Y. (2020). The Relationship between Vitamin K and Osteoarthritis: A Review of Current Evidence. *Nutrients*, 12(5), 1208.
- Chiyoya, M., Seya, K., Yu, Z., Daitoku, K., Motomura, S., Imaizumi, T., Fukuda, I., & Furukawa, K.-I. (2018). Matrix Gla protein negatively regulates calcification of human aortic valve interstitial cells isolated from calcified aortic valves. *Journal of Pharmacological Sciences*, 136(4), 257-265
- Cho, H. K., Jeong, B.-H., & Kim, H. (2020). Clinical course of tracheobronchopathia osteochondroplastica. *Journal of Thoracic Disease*, 12(10), 5571-5579.
- Cinque, L., Forrester, A., Bartolomeo, R., Svelto, M., Venditti, R., Montefusco, S., Polishchuk, E., Nusco, E., Rossi, A., & Medina, D. L. (2015). FGF signalling regulates bone growth through autophagy. *Nature*, 528(7581), 272-275.
- Cobrinik, D., Lee, M.-H., Hannon, G., Mulligan, G., Bronson, R. T., Dyson, N., Harlow, E., Beach, D., Weinberg, R. A., & Jacks, T. (1996). Shared role of the pRB-related p130 and p107 proteins in limb development. *Genes & development*, 10(13), 1633-1644.
- Colvin, J. S., Bohne, B. A., Harding, G. W., McEwen, D. G., & Ornitz, D. M. (1996). Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nature genetics*, 12(4), 390-397.
- Corbit, K. C., Aanstad, P., Singla, V., Norman, A. R., Stainier, D. Y., & Reiter, J. F. (2005). Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature*, 437(7061), 1018-1021.
- Coveney, C. R., Zhu, L., Miotla-Zarebska, J., Stott, B., Parisi, I., Batchelor, V., Duarte, C., Chang, E., McSorley, E., & Vincent, T. L. (2022). Role of ciliary protein intraflagellar transport Protein 88 in the regulation of cartilage thickness and osteoarthritis development in mice. *Arthritis & Rheumatology*, 74(1), 49-59.
- Cranenburg, E. C. M., Van Spaendonck-Zwarts, K. Y., Bonafe, L., Mittaz Crettol, L., Rödiger, L. A., Dikkers, F. G., Van Essen, A. J., Superti-furga, A., Alexandrakis, E., Vermeer, C., Schurgers, L. J., & Laverman, G. D. (2011). Circulating matrix  $\gamma$ -carboxyglutamate protein (MGP) species are refractory to vitamin K treatment in a new case of Keutel syndrome. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9(6), 1225-1235.
- Cuervo, A. M., & Dice, J. F. (1996). A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science*, 273(5274), 501-503.
- D'Adamo, S., Alvarez-Garcia, O., Muramatsu, Y., Flamigni, F., & Lotz, M. K. (2016). MicroRNA-155 suppresses autophagy in chondrocytes by modulating expression of autophagy proteins. *Osteoarthritis and Cartilage*, 24(6), 1082-1091.
- Dailey, L., Ambrosetti, D., Mansukhani, A., & Basilico, C. (2005). Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine & growth factor reviews*, 16(2), 233-247.
- Dailey, L., Laplantine, E., Priore, R., & Basilico, C. (2003). A network of transcriptional and signaling events is activated by FGF to induce chondrocyte growth arrest and differentiation. *The Journal of cell biology*, 161(6), 1053-1066.
- Dam, H. (1935). The Antihæmorrhagic Vitamin of the Chick.: Occurrence And Chemical Nature. *Nature*, 135(3417), 652-653.

- Dan, H., Simsa-Maziel, S., Reich, A., Sela-Donenfeld, D., & Monsonego-Ornan, E. (2012). The Role of Matrix Gla Protein in Ossification and Recovery of the Avian Growth Plate. *Frontiers in Endocrinology* 3, 79.
- Danino, T., Volfson, D., Bhatia, S. N., Tsimring, L., & Hasty, J. (2011). In-Silico Patterning of Vascular Mesenchymal Cells in Three Dimensions. *PLoS ONE*, 6(5), e20182.
- Davidson, D., Blanc, A., Fillion, D., Wang, H., Plut, P., Pfeffer, G., Buschmann, M. D., & Henderson, J. E. (2005). Fibroblast growth factor (FGF) 18 signals through FGF receptor 3 to promote chondrogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 280(21), 20509-20515.
- Davidson, E. B., Van Caam, A., Vitters, E., Bennink, M., Thijssen, E., Van Den Berg, W., Koenders, M., Van Lent, P., Van De Loo, F., & Van Der Kraan, P. (2015). TGF- $\beta$  is a potent inducer of Nerve Growth Factor in articular cartilage via the ALK5-Smad2/3 pathway. Potential role in OA related pain? *Osteoarthritis and Cartilage*, 23(3), 478-486.
- Day, T. F., Guo, X., Garrett-Beal, L., & Yang, Y. (2005). Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Mesenchymal Progenitors Controls Osteoblast and Chondrocyte Differentiation during Vertebrate Skeletogenesis. *Developmental Cell*, 8(5), 739-750.
- de Frutos, C. A., Vega, S., Manzanares, M., Flores, J. M., Huertas, H., Martínez-Frías, M. L., & Nieto, M. A. (2007). Snail1 is a transcriptional effector of FGFR3 signaling during chondrogenesis and achondroplasias. *Developmental cell*, 13(6), 872-883.
- Delanaye, P., Krzesinski, J.-M., Warling, X., Moonen, M., Smelten, N., Médart, L., Pottel, H., & Cavalier, E. (2014). Dephosphorylated-uncarboxylated Matrix Gla protein concentration is predictive of vitamin K status and is correlated with vascular calcification in a cohort of hemodialysis patients. *BMC nephrology*, 15(1), 1-8.
- den Hollander, W., Boer, C. G., Hart, D. J., Yau, M. S., Ramos, Y. F. M., Metrustry, S., Broer, L., Deelen, J., Cupples, L. A., Rivadeneira, F., Kloppenburg, M., Peters, M., Spector, T. D., Hofman, A., Slagboom, P. E., Nelissen, R. G. H. H., Uitterlinden, A. G., Felson, D. T., Valdes, A. M., ... van Meurs, J. J. B. (2017). Genome-wide association and functional studies identify a role for matrix Gla protein in osteoarthritis of the hand. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 76(12), 2046-2053.
- Deng, C., Wynshaw-Boris, A., Zhou, F., Kuo, A., & Leder, P. (1996). Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell*, 84(6), 911-921.
- Deo, D. D., Axelrad, T. W., Robert, E. G., Marcheselli, V., Bazan, N. G., & Hunt, J. D. (2002). Phosphorylation of STAT-3 in response to basic fibroblast growth factor occurs through a mechanism involving platelet-activating factor, JAK-2, and Src in human umbilical vein endothelial cells: evidence for a dual kinase mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 277(24), 21237-21245.
- Devriendt, K., Holvoet, M., & Fryns, J.-P. (1999). Follow-up of an adult with Keutel syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, 85(1), 82-83.
- Dice, J. F. (1990). Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends in biochemical sciences*, 15(8), 305-309.
- Ding, H., Wang, C., Zhang, T., & Wang, K. (2006). Fibronectin enhances in vitro vascular calcification by promoting osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells via ERK pathway. *Journal of cellular biochemistry*, 99(5), 1343-1352.
- Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., Patel, D. N., Bauer, A. J., Cantley, A. M., Yang, W. S., Morrison, B., III, & Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell*, 149(5), 1060-1072.
- Doherty, T. M., Asotra, K., Fitzpatrick, L. A., Qiao, J.-H., Wilkin, D. J., Detrano, R. C., Dunstan, C. R., Shah, P. K., & Rajavashisth, T. B. (2003). Calcification in atherosclerosis: Bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(20), 11201-11206.
- Donnelly, D. E., McConnell, V., Paterson, A., & Morrison, P. J. (2010). The prevalence of thanatophoric dysplasia and lethal osteogenesis imperfecta type II in Northern Ireland—a complete population study. *The Ulster Medical Journal*, 79(3), 114.
- Dorn, K. V., Hughes, C. E., & Rohatgi, R. (2012). A Smoothed-Evc2 complex transduces the Hedgehog signal at primary cilia. *Developmental cell*, 23(4), 823-835.
- Dowd, T. L., Rosen, J. F., Li, L., & Gundberg, C. M. (2003). The Three-Dimensional Structure of Bovine Calcium Ion-Bound Osteocalcin Using  $^1\text{H}$  NMR Spectroscopy. *Biochemistry*, 42(25), 7769-7779.
- Ducy, P., Desbois, C., Boyce, B., Pinero, G., Story, B., Dunstan, C., Smith, E., Bonadio, J., Goldstein, S., Gundberg, C., Bradley, A., & Karsenty, G. (1996). Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*, 382(6590), 448-452.
- Ducy, P., Starbuck, M., Priemel, M., Shen, J., Pinero, G., Geoffroy, V., Amling, M., & Karsenty, G. (1999). A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes & development*, 13(8), 1025-1036.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L., & Karsenty, G. (1997). Osf2/Cbfa1: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. *cell*, 89(5), 747-754.

- Dy, P., Wang, W., Bhattaram, P., Wang, Q., Wang, L., Ballock, R. T., & Lefebvre, V. (2012). Sox9 directs hypertrophic maturation and blocks osteoblast differentiation of growth plate chondrocytes. *Developmental cell*, 22(3), 597-609.
- Ea, C., Hennocq, Q., Picard, A., Polak, M., Collet, C., Legeai-Mallet, L., Arnaud, É., Paternoster, G., & Khonsari, R. H. (2022). Growth charts in FGFR2- and FGFR3-related faciocraniosynostoses. *Bone Reports*, 16, 101524.
- Eitzinger, N., Surmann-Schmitt, C., Bösl, M., Schett, G., Engelke, K., Hess, A., von der Mark, K., & Stock, M. (2012). Ucmr is not necessary for normal development of the mouse skeleton. *Bone*, 50(3), 670-680.
- Elliott, K. H., & Brugmann, S. A. (2019). Sending mixed signals: Cilia-dependent signaling during development and disease. *Developmental Biology*, 447(1), 28-41.
- Elliott, K. H., Millington, G., & Brugmann, S. A. (2018). A novel role for cilia-dependent sonic hedgehog signaling during submandibular gland development. *Developmental Dynamics*, 247(6), 818-831.
- El-Maadawy, S., Kaartinen, M. T., Schinke, T., Murshed, M., Karsenty, G., & McKee, M. D. (2003). Cartilage Formation and Calcification in Arteries of Mice Lacking Matrix Gla Protein. *Connective Tissue Research*, 44(1), 272-278.
- Emons, J., Chagin, A. S., Säwendahl, L., Karperien, M., & Wit, J. M. (2011). Mechanisms of Growth Plate Maturation and Epiphyseal Fusion. *Hormone Research in Paediatrics*, 75(6), 383-391.
- Enomoto-Iwamoto, M., Kitagaki, J., Koyama, E., Tamamura, Y., Wu, C., Kanatani, N., Koike, T., Okada, H., Komori, T., & Yoneda, T. (2002). The Wnt antagonist Frzb-1 regulates chondrocyte maturation and long bone development during limb skeletogenesis. *Developmental biology*, 251(1), 142-156.
- Fader, C. M., Sánchez, D. G., Mestre, M. B., & Colombo, M. I. (2009). TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1793(12), 1901-1916.
- Fallon, J. F., López, A., Ros, M. A., Savage, M. P., Olwin, B. B., & Simandl, B. K. (1994). FGF-2: apical ectodermal ridge growth signal for chick limb development. *Science*, 264(5155), 104-107.
- Farzaneh-Far, A., Davies, J. D., Braam, L. A., Spronk, H. M., Proudfoot, D., Chan, S.-W., O'Shaughnessy, K. M., Weissberg, P. L., Vermeer, C., & Shanahan, C. M. (2001). A Polymorphism of the Human Matrix  $\gamma$ -Carboxyglutamic Acid Protein Promoter Alters Binding of an Activating Protein-1 Complex and Is Associated with Altered Transcription and Serum Levels \*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(35), 32466-32473.
- Ferron, M., McKee, M. D., Levine, R. L., Ducky, P., & Karsenty, G. (2012). Intermittent injections of osteocalcin improve glucose metabolism and prevent type 2 diabetes in mice. *Bone*, 50(2), 568-575.
- Ferron, M., Wei, J., Yoshizawa, T., Del Fattore, A., DePinho, R. A., Teti, A., Ducky, P., & Karsenty, G. (2010). Insulin Signaling in Osteoblasts Integrates Bone Remodeling and Energy Metabolism. *Cell*, 142(2), 296-308.
- Feskanich, D., Weber, P., Willett, W. C., Rockett, H., Booth, S. L., & Colditz, G. A. (1999). Vitamin K intake and hip fractures in women: a prospective study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69(1), 74-79.
- Fraser, J. D., & Price, P. A. (1988a). Lung, heart, and kidney express high levels of mRNA for the vitamin K-dependent matrix Gla protein. Implications for the possible functions of matrix Gla protein and for the tissue distribution of the gamma-carboxylase. *Journal of Biological Chemistry*, 263(23), 11033-11036.
- French, T., & Savarirayan, R. (2020). *Thanatophoric dysplasia*.
- Fröbisch, N. B., & Shubin, N. H. (2011). Salamander limb development: Integrating genes, morphology, and fossils. *Developmental Dynamics*, 240(5), 1087-1099.
- Fromental-Ramain, C., Warot, X., Messadecq, N., LeMeur, M., Dollé, P., & Chambon, P. (1996). Hoxa-13 and Hoxd-13 play a crucial role in the patterning of the limb autopod. *Development*, 122(10), 2997-3011.
- Fu, S., Thompson, C., Ali, A., Wang, W., Chapple, J., Mitchison, H., Beales, P., Wann, A., & Knight, M. (2019). Mechanical loading inhibits cartilage inflammatory signalling via an HDAC6 and IFT-dependent mechanism regulating primary cilia elongation. *Osteoarthritis and cartilage*, 27(7), 1064-1074.
- Fu, X., Qiu, R., Tang, C., Wang, X., Cheng, X., & Yin, M. (2018). Effects of GGX overexpression on anterior cruciate ligament transection-induced osteoarthritis in rabbits. *Molecular Medicine Reports*, 17(3), 3821-3828.
- Fu, X., Wu, J., Cheng, X., Deng, R., Wang, W., Wang, X., & Wu, T. (2017). Effects of gamma-glutamyl carboxylase gene overexpression on the differentiation of chondrocytes from osteoarthritis rabbits. *Int. J. Clin. Exp. Med*, 10, 9096-9102.
- Fujita, N., Itoh, T., Omori, H., Fukuda, M., Noda, T., & Yoshimori, T. (2008). The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Molecular biology of the cell*, 19(5), 2092-2100.
- Furumatsu, T., Ozaki, T., & Asahara, H. (2009). Smad3 activates the Sox9-dependent transcription on chromatin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(5), 1198-1204.
- Furuta, N., Fujita, N., Noda, T., Yoshimori, T., & Amano, A. (2010). Combinational soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor proteins VAMP8 and Vti1b mediate fusion of antimicrobial and canonical autophagosomes with lysosomes. *Molecular biology of the cell*, 21(6), 1001-1010.

- Furuya, N., Yu, J., Byfield, M., Pattingre, S., & Levine, B. (2005). The evolutionarily conserved domain of Beclin 1 is required for Vps34 binding, autophagy, and tumor suppressor function. *Autophagy*, *1*(1), 46-52.
- Galea, G. L., Zein, M. R., Allen, S., & Francis-West, P. (2021). Making and shaping endochondral and intramembranous bones. *Developmental Dynamics*, *250*(3), 414-449.
- Gamal, R., Elsayed, S. M., El-Sobky, T. A., & Elabd, H. S. (2017). Pseudoachondroplasia in a child: the role of anthropometric measurements and skeletal imaging in differential diagnosis. *The Egyptian Journal of Radiology and Nuclear Medicine*, *48*(1), 245-250.
- Gamer, L. W., Pregizer, S., Gamer, J., Feigenson, M., Ionescu, A., Li, Q., Han, L., & Rosen, V. (2018). The role of Bmp2 in the maturation and maintenance of the murine knee joint. *Journal of Bone and Mineral Research*, *33*(9), 1708-1717.
- Gamerding, M., Hajieva, P., Kaya, A. M., Wolfrum, U., Hartl, F. U., & Behl, C. (2009). Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *The EMBO journal*, *28*(7), 889-901.
- Ganley, I. G., Lam, D. H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., & Jiang, X. (2009). ULK1·ATG13·FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(18), 12297-12305.
- Garofalo, S., Klinger-Spatz, M., Cooke, J. L., Wolstin, O., Lunstrum, G. P., Moshkovitz, S. M., Horton, W. A., & Yayon, A. (1999). Skeletal dysplasia and defective chondrocyte differentiation by targeted overexpression of fibroblast growth factor 9 in transgenic mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, *14*(11), 1909-1915.
- Geister, K. A., & Camper, S. A. (2015). Advances in Skeletal Dysplasia Genetics. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *16*(1), 199-227.
- Geng, J., & Klionsky, D. J. (2008). The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. *EMBO reports*, *9*(9), 859-864.
- Gheorghe, S. R., Vermeer, C., Olteanu, G., Silaghi, C. N., & Crăciun, A. M. (2021). The Active Isoforms of MGP Are Expressed in Healthy and Varicose Veins without Calcification. *Journal of Clinical Medicine*, *10*(24), 5896.
- Ghosh, S., Oldenburg, J., & Czogalla-Nitsche, K. J. (2022). The Role of GRP and MGP in the Development of Non-Hemorrhagic VKCFD1 Phenotypes. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(2),
- Gigout, A., Guehring, H., Froemel, D., Meurer, A., Ladel, C., Reker, D., Bay-Jensen, A., Karsdal, M., & Lindemann, S. (2017). Sprifermin (rhFGF18) enables proliferation of chondrocytes producing a hyaline cartilage matrix. *Osteoarthritis and Cartilage*, *25*(11), 1858-1867.
- Gilbert, L. (2000). Inhibition of Osteoblast Differentiation by Tumor Necrosis Factor-. *Endocrinology*, *141*(11), 3956-3964.
- Girit, S., & Senol, E. (2019). A rare diagnosis: Keutel Syndrome. *Medeniyet Medical Journal*, *34*(3), 329-332.
- Gomez, G. A., Aghajanian, P., Pourteymoor, S., Larkin, D., & Mohan, S. (2022). Differences in pathways contributing to thyroid hormone effects on postnatal cartilage calcification versus secondary ossification center development. *eLife*, *11*, e76730.
- Griffin, T. P., Islam, M. N., Wall, D., Ferguson, J., Griffin, D. G., Griffin, M. D., & O'Shea, P. M. (2019). Plasma dephosphorylated-uncarboxylated Matrix Gla-Protein (dp-ucMGP): reference intervals in Caucasian adults and diabetic kidney disease biomarker potential. *Scientific reports*, *9*(1), 1-13.
- Gröber, U., Reichrath, J., Holick, M., & Kisters, K. (2014). Vitamin K: an old vitamin in a new perspective. *Dermato-Endocrinology*, *6*(1), e968490.
- Guasto, A., & Cormier-Daire, V. (2021). Signaling Pathways in Bone Development and Their Related Skeletal Dysplasia. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(9), 4321.
- Guihard, P. J., Guo, Y., Wu, X., Zhang, L., Yao, J., Jumabay, M., Yao, Y., Garfinkel, A., & Boström, K. I. (2020). Shaping Waves of Bone Morphogenetic Protein Inhibition During Vascular Growth. *Circulation Research*, *127*(10), 1288-1305.
- Guo, J., Chung, U.-I., Kondo, H., Bringhurst, F. R., & Kronenberg, H. M. (2002). The PTH/PTHrP receptor can delay chondrocyte hypertrophy in vivo without activating phospholipase C. *Developmental cell*, *3*(2), 183-194.
- Guo, X., Shan, C., Hou, Y., Zhu, G., Tao, B., Sun, L., Zhao, H., Ning, G., Li, S., & Liu, J. (2018). Osteocalcin Ameliorates Motor Dysfunction in a 6-Hydroxydopamine-Induced Parkinson's Disease Rat Model Through AKT/GSK3β Signaling. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *11*.
- H. Trad, C., & Butterfield, D. A. (1994). Menadione-induced cytotoxicity effects on human erythrocyte membranes studied by electron paramagnetic resonance. *Toxicology Letters*, *73*(2), 145-155.
- Hackeng, T. M., Rosing, J., Spronk, H. M. H., & Vermeer, C. (2001). Total chemical synthesis of human matrix Gla protein. *Protein Science*, *10*(4), 864-870.
- Hadari, Y., Kouhara, H., Lax, I., & Schlessinger, J. (1998). Binding of Shp2 tyrosine phosphatase to FRS2 is essential for fibroblast growth factor induced PC12 cell differentiation. *Molecular and cellular biology*, *18*(7), 3966-3973.
- Hadjidakis, D. J., & Androulakis, I. I. (2006). Bone Remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1092*(1), 385-396.

- Hafsia, N., Forien, M., Renaudin, F., Delacour, D., Reboul, P., Van Lent, P., Cohen-Solal, M., Lioté, F., Poirier, F., & Ea, H. K. (2020). Galectin 3 Deficiency Alters Chondrocyte Primary Cilium Formation and Exacerbates Cartilage Destruction via Mitochondrial Apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(4), 1486.
- Hale, J. E., Fraser, J. D., & Price, P. A. (1988). The identification of matrix Gla protein in cartilage. *Journal of Biological Chemistry*, *263*(12), 5820-5824.
- Hall, B. K. (2005). Chapter 3 - Cartilage. In B. K. Hall (Éd.), *Bones and Cartilage* (p. 33-47). Academic Press.
- Hall, B. K., & Miyake, T. (2000). All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays*, *22*(2), 138-147.
- Hallett, S. A., Ono, W., & Ono, N. (2019). Growth Plate Chondrocytes: Skeletal Development, Growth and Beyond. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(23), 6009.
- Halloran, D., Durbano, H. W., & Nohe, A. (2020). Bone Morphogenetic Protein-2 in Development and Bone Homeostasis. *Journal of Developmental Biology*, *8*(3).
- Han, Y., & Lefebvre, V. (2008). L-Sox5 and Sox6 drive expression of the aggrecan gene in cartilage by securing binding of Sox9 to a far-upstream enhancer. *Molecular and cellular biology*, *28*(16), 4999-5013.
- Hanada, T., Noda, N. N., Satomi, Y., Ichimura, Y., Fujioka, Y., Takao, T., Inagaki, F., & Ohsumi, Y. (2007). The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(52), 37298-37302.
- Hara, T., Takamura, A., Kishi, C., Iemura, S., Natsume, T., Guan, J.-L., & Mizushima, N. (2008). FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *The Journal of cell biology*, *181*(3), 497-510.
- Hariri, E., Kassis, N., Iskandar, J.-P., Schurgers, L. J., Saad, A., Abdelfattah, O., Bansal, A., Isogai, T., Harb, S. C., & Kapadia, S. (2021). Vitamin K<sub>2</sub> —a neglected player in cardiovascular health: a narrative review. *Open Heart*, *8*(2), e001715.
- Harshman, S. G., & Shea, M. K. (2016). The Role of Vitamin K in Chronic Aging Diseases: Inflammation, Cardiovascular Disease, and Osteoarthritis. *Current Nutrition Reports*, *5*(2), 90-98.
- Hartmann, C., & Tabin, C. J. (2000). Dual roles of Wnt signaling during chondrogenesis in the chicken limb. *Development*, *127*(14), 3141-3159.
- Haseeb, A., Kc, R., Angelozzi, M., de Charleroy, C., Rux, D., Tower, R. J., Yao, L., Pellegrino da Silva, R., Pacifici, M., Qin, L., & Lefebvre, V. (2021). SOX9 keeps growth plates and articular cartilage healthy by inhibiting chondrocyte dedifferentiation/osteoblastic redifferentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*(8)
- Hashimoto, F., Kobayashi, Y., Kobayashi, E. T., Sakai, E., Kobayashi, K., Shibata, M., Kato, Y., & Sakai, H. (2001). Expression and localization of MGP in rat tooth cementum. *Archives of Oral Biology*, *46*(7), 585-592.
- Hashimoto, K., Hasegawa, T., Yamamoto, T., Hongo, H., Imin, Y., Abe, M., Nasoori, A., Nakanishi, K., Maruoka, H., Morimoto, Y., Kubota, K., Shimizu, T., Haraguchi, M., Takahata, M., Iwasaki, N., Li, M., Fujisawa, T., & Amizuka, N. (2021). Histological observation on the initial stage of vascular invasion into the secondary ossification of murine femoral epiphyseal cartilage. *Biomedical Research*, *42*(4), 139-151.
- Hata, K., Takahata, Y., Murakami, T., & Nishimura, R. (2017). Transcriptional Network Controlling Endochondral Ossification. *Journal of Bone Metabolism*, *24*(2), 75.
- Hattori, T., Müller, C., Gebhard, S., Bauer, E., Pausch, F., Schlund, B., Bösl, M. R., Hess, A., Surmann-Schmitt, C., & Von Der Mark, H. (2010). SOX9 is a major negative regulator of cartilage vascularization, bone marrow formation and endochondral ossification. *Development*, *137*(6), 901-911.
- Havens, B. A., Velonis, D., Kronenberg, M. S., Lichtler, A. C., Oliver, B., & Mina, M. (2008). Roles of FGFR3 during morphogenesis of Meckel's cartilage and mandibular bones. *Developmental biology*, *316*(2), 336-349.
- Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T., & Yamamoto, A. (2009). A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nature cell biology*, *11*(12), 1433-1437.
- Haycraft, C. J., Zhang, Q., Song, B., Jackson, W. S., Detloff, P. J., Serra, R., & Yoder, B. K. (2007). *Intraflagellar transport is essential for endochondral bone formation*, *Development (Cambridge, England)*, *134*(2), 307-316.
- He, C., & Klionsky, D. J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual review of genetics*, *43*.
- Hecht, J. T., Nelson, L. D., Crowder, E., Wang, Y., Elder, F. F., Harrison, W. R., Francomano, C. A., Prange, C. K., Lennon, G. G., & Deere, M. (1995). Mutations in exon 17B of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) cause pseudoachondroplasia. *Nature genetics*, *10*(3), 325-329.
- Herman, T., & Siegel, M. (2012). Thanatophoric dysplasia, type I. *Journal of Perinatology*, *32*(6), 476-478.
- Heuertz, S., Le Merrer, M., Zabel, B., Wright, M., Legeai-Mallet, L., Cormier-Daire, V., Gibbs, L., & Bonaventure, J. (2006). Novel FGFR3 mutations creating cysteine residues in the extracellular domain of the receptor cause achondroplasia or severe forms of hypochondroplasia. *European Journal of Human Genetics*, *14*(12), 1240-1247.
- Hill, T. P., Später, D., Taketo, M. M., Birchmeier, W., & Hartmann, C. (2005). Canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Developmental cell*, *8*(5), 727-738.

- Hilton, M. J., Tu, X., Cook, J., Hu, H., & Long, F. (2005). *Ihh controls cartilage development by antagonizing Gli3 but requires additional effectors to regulate osteoblast and vascular development. Development (Cambridge, England), 132(19), 4339–4351.*
- Hirota, Y., Tsugawa, N., Nakagawa, K., Suhara, Y., Tanaka, K., Uchino, Y., Takeuchi, A., Sawada, N., Kamao, M., Wada, A., Okitsu, T., & Okano, T. (2013). Menadione (Vitamin K3) Is a Catabolic Product of Oral Phylloquinone (Vitamin K1) in the Intestine and a Circulating Precursor of Tissue Menaquinone-4 (Vitamin K2) in Rats. *Journal of Biological Chemistry, 288(46), 33071-33080.*
- Horigome, Y., Ida-Yonemochi, H., Waguri, S., Shibata, S., Endo, N., & Komatsu, M. (2020). Loss of autophagy in chondrocytes causes severe growth retardation. *Autophagy, 16(3), 501-511.*
- Horton, W. A., Hall, J. G., & Hecht, J. T. (2007). Achondroplasia. *The Lancet, 370(9582), 162-172.*
- Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., & Yamada, N. (2009). Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1–Atg13–FIP200 complex required for autophagy. *Molecular biology of the cell, 20(7), 1981-1991.*
- Hosokawa, N., Sasaki, T., Iemura, S., Natsume, T., Hara, T., & Mizushima, N. (2009). Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy, 5(7), 973-979.*
- Houtman, E., Coutinho de Almeida, R., Tuerlings, M., Suchiman, H. E. D., Broekhuis, D., Nelissen, R. G. H. H., Ramos, Y. F. M., van Meurs, J. B. J., & Meulenbelt, I. (2021). Characterization of dynamic changes in Matrix Gla Protein (MGP) gene expression as function of genetic risk alleles, osteoarthritis relevant stimuli, and the vitamin K inhibitor warfarin. *Osteoarthritis and Cartilage, 29(8), 1193-1202.*
- Houtman, E., de Almeida, R. C., Tuerlings, M., Suchiman, H., Broekhuis, D., Nelissen, R., Ramos, Y., van Meurs, J., & Meulenbelt, I. (2021). Characterization of dynamic changes in Matrix Gla Protein (MGP) gene expression as function of genetic risk alleles, osteoarthritis relevant stimuli, and the vitamin K inhibitor warfarin. *Osteoarthritis and Cartilage, 29(8), 1193-1202.*
- Hruska, K. A., Mathew, S., & Saab, G. (2005). Bone Morphogenetic Proteins in Vascular Calcification. *Circulation Research, 97(2), 105-114.*
- Huang, W., Chung, U., Kronenberg, H. M., & de Crombrugge, B. (2001). The chondrogenic transcription factor Sox9 is a target of signaling by the parathyroid hormone-related peptide in the growth plate of endochondral bones. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 98(1), 160-165.*
- Huangfu, D., & Anderson, K. V. (2005). Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 102(32), 11325-11330.*
- Huangfu, D., Liu, A., Rakeman, A. S., Murcia, N. S., Niswander, L., & Anderson, K. V. (2003). Hedgehog signaling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature, 426(6962), 83-87.*
- Hui, W., Cao, Z., Wang, X., & Zhu, J. (2019). Association of matrix Gla protein polymorphism and knee osteoarthritis in a chinese population. *Bioscience Reports, 39(1), BSR20182228.*
- Hung, I. H., Yu, K., Lavine, K. J., & Ornitz, D. M. (2007). FGF9 regulates early hypertrophic chondrocyte differentiation and skeletal vascularization in the developing stylopod. *Developmental biology, 307(2), 300-313.*
- Hur, D. J., Raymond, G. V., Kahler, S. G., Riegert-Johnson, D. L., Cohen, B. A., & Boyadjiev, S. A. (2005). A novel MGP mutation in a consanguineous family: Review of the clinical and molecular characteristics of Keutel syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A, 135A(1), 36-40.*
- Hwang, S., White, K. A., Somatilaka, B. N., Shelton, J. M., Richardson, J. A., & Mukhopadhyay, S. (2017). The G-protein-coupled receptor Gpr161 regulates forelimb formation, limb patterning and skeletal morphogenesis in a primary cilium-dependent manner. *Development, dev.154054.*
- Ichihashi, Y., Takagi, M., Ishii, T., Watanabe, K., Nishimura, G., & Hasegawa, T. (2018). Two novel mutations of COMP in Japanese boys with pseudoachondroplasia. *Human genome variation, 5(1), 1-3.*
- Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., & Ohsumi, M. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature, 408(6811), 488-492.*
- Iijima, H., Aoyama, T., Ito, A., Tajino, J., Yamaguchi, S., Nagai, M., Kiyama, W., Zhang, X., & Kuroki, H. (2016). Exercise intervention increases expression of bone morphogenetic proteins and prevents the progression of cartilage-subchondral bone lesions in a post-traumatic rat knee model. *Osteoarthritis and Cartilage, 24(6), 1092-1102.*
- Iimura, T., Denans, N., & Pourquié, O. (2009). Establishment of Hox vertebral identities in the embryonic spine precursors. *Current topics in developmental biology, 88, 201-234.*
- Ikegami, D., Akiyama, H., Suzuki, A., Nakamura, T., Nakano, T., Yoshikawa, H., & Tsumaki, N. (2011). Sox9 sustains chondrocyte survival and hypertrophy in part through Pik3ca-Akt pathways. *Development, 138(8), 1507-1519.*

- Im, H.-J., Li, X., Muddasani, P., Kim, G.-H., Davis, F., Rangan, J., Forsyth, C. B., Ellman, M., & Thonar, E. J. (2008). Basic fibroblast growth factor accelerates matrix degradation via a neuro-endocrine pathway in human adult articular chondrocytes. *Journal of Cellular Physiology*, *215*(2), 452-463.
- Inada, M., Yasui, T., Nomura, S., Miyake, S., Deguchi, K., Himeno, M., Sato, M., Yamagiwa, H., Kimura, T., Yasui, N., Ochi, T., Endo, N., Kitamura, Y., Kishimoto, T., & Komori, T. (1999). Maturational disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. *Developmental Dynamics*, *214*(4), 279-290.
- Ionescu, A., Kozhemyakina, E., Nicolae, C., Kaestner, K. H., Olsen, B. R., & Lassar, A. B. (2012a). FoxA Family Members Are Crucial Regulators of the Hypertrophic Chondrocyte Differentiation Program. *Developmental Cell*, *22*(5), 927-939.
- Isakson, P., Holland, P., & Simonsen, A. (2013). The role of ALFY in selective autophagy. *Cell Death & Differentiation*, *20*(1), 12-20.
- Ishikawa, H., & Marshall, W. F. (2011). Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *12*(4), 222-234.
- Itakura, E., Kishi, C., Inoue, K., & Mizushima, N. (2008). Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Molecular biology of the cell*, *19*(12), 5360-5372.
- Itakura, E., Kishi-Itakura, C., & Mizushima, N. (2012). The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell*, *151*(6), 1256-1269.
- Itakura, E., & Mizushima, N. (2010). Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy*, *6*(6), 764-776.
- Itoh, N., Ohta, H., Nakayama, Y., & Konishi, M. (2016). Roles of FGF signals in heart development, health, and disease. *Frontiers in cell and developmental biology*, *4*, 110.
- Itoh, T., Fujita, N., Kanno, E., Yamamoto, A., Yoshimori, T., & Fukuda, M. (2008). Golgi-resident small GTPase Rab33B interacts with Atg16L and modulates autophagosome formation. *Molecular biology of the cell*, *19*(7), 2916-2925.
- Ivanova, D., Zhelev, Z., Getsov, P., Nikolova, B., Aoki, I., Higashi, T., & Bakalova, R. (2018). Vitamin K: Redox-modulation, prevention of mitochondrial dysfunction and anticancer effect. *Redox Biology*, *16*, 352-358.
- Iwamoto, M., Kitagaki, J., Tamamura, Y., Gentili, C., Koyama, E., Enomoto, H., Komori, T., Pacifici, M., & Enomoto-Iwamoto, M. (2003). Runx2 expression and action in chondrocytes are regulated by retinoid signaling and parathyroid hormone-related peptide (PTHrP). *Osteoarthritis and cartilage*, *11*(1), 6-15.
- Iwata, T., Chen, L., Li, C., Ovchinnikov, D. A., Behringer, R. R., Francomano, C. A., & Deng, C.-X. (2000). A neonatal lethal mutation in FGFR3 uncouples proliferation and differentiation of growth plate chondrocytes in embryos. *Human molecular genetics*, *9*(11), 1603-1613.
- Izawa, I., Goto, H., Kasahara, K., & Inagaki, M. (2015). Current topics of functional links between primary cilia and cell cycle. *Cilia*, *4*(1), 12.
- Jacob, A. L., Smith, C., Partanen, J., & Ornitz, D. M. (2006). Fibroblast growth factor receptor 1 signaling in the osteochondrogenic cell lineage regulates sequential steps of osteoblast maturation. *Developmental biology*, *296*(2), 315-328.
- Jacob, P., Soni, J. P., Mortier, G., & Girisha, K. M. (2019). The third family with Eiken syndrome. *Clinical Genetics*, *96*(4), 378-379.
- Jager, S., Bucci, C., Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., Saftig, P., & Eskelinen, E.-L. (2004). Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *Journal of cell science*, *117*(20), 4837-4848.
- Jensen, V. L., Lambacher, N. J., Li, C., Mohan, S., Williams, C. L., InGlis, P. N., Yoder, B. K., Blacque, O. E., & Leroux, M. R. (2018). Role for intraflagellar transport in building a functional transition zone. *EMBO reports*, *19*(12), e45862.
- Jiang, J., & Struhl, G. (1995). Protein kinase A and hedgehog signaling in Drosophila limb development. *Cell*, *80*(4), 563-572.
- Johansen, T., & Lamark, T. (2011). Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*, *7*(3), 279-296.
- Jung, C. H., Jun, C. B., Ro, S.-H., Kim, Y.-M., Otto, N. M., Cao, J., Kundu, M., & Kim, D.-H. (2009). ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Molecular biology of the cell*, *20*(7), 1992-2003.
- Julien, M., Khoshniat, S., Lacreusette, A., Gatius, M., Bozec, A., Wagner, E. F., Wittrant, Y., Masson, M., Weiss, P., & Beck, L. (2009). Phosphate-dependent regulation of MGP in osteoblasts: Role of ERK1/2 and Fra-1. *Journal of Bone and Mineral Research*, *24*(11), 1856-1868.
- Julien, M., Magne, D., Masson, M., Rolli-Derkinderen, M., Chassande, O., Cario-Toumaniantz, C., Cherel, Y., Weiss, P., & Guicheux, J. (2007). Phosphate stimulates matrix Gla protein expression in chondrocytes through the extracellular signal regulated kinase signaling pathway. *Endocrinology*, *148*(2), 530-537.
- Kaartinen, M. T., Murshed, M., Karsenty, G., & McKee, M. D. (2007). Osteopontin Upregulation and Polymerization by Transglutaminase 2 in Calcified Arteries of Matrix Gla Protein-deficient Mice. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *55*(4), 375-386.

- Kaestner, K. H., Hiemisch, H., & Schütz, G. (1998). Targeted disruption of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 3 $\gamma$  results in reduced transcription of hepatocyte-specific genes. *Molecular and Cellular Biology*, *18*(7), 4245-4251
- Kaipatur, N., Murshed, M., & McKee, M. (2008). Matrix Gla protein inhibition of tooth mineralization. *Journal of dental research*, *87*(9), 839-844
- Kanazawa, I., Tanaka, K., Ogawa, N., Yamauchi, M., Yamaguchi, T., & Sugimoto, T. (2013). Undercarboxylated osteocalcin is positively associated with free testosterone in male patients with type 2 diabetes mellitus. *Osteoporosis International*, *24*(3), 1115-1119.
- Kang, X., Yang, W., Feng, D., Jin, X., Ma, Z., Qian, Z., Xie, T., Li, H., Liu, J., Wang, R., Li, F., Li, D., Sun, H., & Wu, S. (2017). Cartilage-Specific Autophagy Deficiency Promotes ER Stress and Impairs Chondrogenesis in PERK-ATF4-CHOP-Dependent Manner. *Journal of Bone and Mineral Research*, *32*(10), 2128-2141
- Karaplis, A. C., Luz, A., Glowacki, J., Bronson, R. T., Tybulewicz, V., Kronenberg, H. M., & Mulligan, R. C. (1994). Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes & development*, *8*(3), 277-289.
- Karp, S. J., Schipani, E., St-Jacques, B., Hunzelman, J., Kronenberg, H., & McMahon, A. P. (2000). Indian hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via parathyroid hormone related-protein-dependent and-independent pathways. *Development*, *127*(3), 543-548.
- Kaur, J., & Debnath, J. (2015). Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nature reviews Molecular cell biology*, *16*(8), 461-472.
- Keutel, J., Jörgensen, G., & Gabriel, P. (2009). Ein neues autosomal-rezessiv vererbbares Syndrom. *Dtsch Med Wochenschr*, *96*(43), 1676-1681
- Khavandgar, Z., Roman, H., Li, J., Lee, S., Vali, H., Brinckmann, J., Davis, E. C., & Murshed, M. (2014). Elastin haploinsufficiency impedes the progression of arterial calcification in MGP-deficient mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, *29*(2), 327-337.
- Khosroshahi, H. E., Sahin, S. C., Akyuz, Y., & Ede, H. (2014). Long term follow-up of four patients with Keutel syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, *164*(11), 2849-2856.
- Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N., & Ohsumi, Y. (2001). Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology*, *152*(3), 519-530.
- Khoshniat, S., Bourguine, A., Julien, M., Petit, M., Pilet, P., Rouillon, T., Masson, M., Gatus, M., Weiss, P., & Guicheux, J. (2011). Phosphate-dependent stimulation of MGP and OPN expression in osteoblasts via the ERK1/2 pathway is modulated by calcium. *Bone*, *48*(4), 894-902.
- Kim, D.-W., & Lassar, A. B. (2003). Smad-dependent recruitment of a histone deacetylase/Sin3A complex modulates the bone morphogenetic protein-dependent transcriptional repressor activity of Nkx3. 2. *Molecular and cellular biology*,
- Kim, E.-J., Cho, S.-W., Shin, J.-O., Lee, M.-J., Kim, K.-S., & Jung, H.-S. (2013). Ihh and Runx2/Runx3 signaling interact to coordinate early chondrogenesis: a mouse model. *PLoS one*, *8*(2), e55296.
- Kim, J., Dalton, V. M., Eggerton, K. P., Scott, S. V., & Klionsky, D. J. (1999). Apg7p/Cvt2p Is Required for the Cytoplasm-to-Vacuole Targeting, Macroautophagy, and Peroxisome Degradation Pathways. *Molecular Biology of the Cell*, *10*(5), 1337-1351.
- Kim, S., Lee, K., Choi, J.-H., Ringstad, N., & Dynlacht, B. D. (2015). Nek2 activation of Kif24 ensures cilium disassembly during the cell cycle. *Nature Communications*, *6*(1), 8087.
- Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T., & Ohsumi, Y. (1999). Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *The Journal of cell biology*, *147*(2), 435-446.
- Kirkpatrick, T., Au, K., Mastrobattista, J., McCready, M., Bulman, D., & Northrup, H. (2003). Identification of a mutation in the Indian Hedgehog (IHH) gene causing brachydactyly type A1 and evidence for a third locus. *Journal of medical genetics*, *40*(1), 42-44.
- Kirkpatrick, T. J. (2003). Identification of a mutation in the Indian Hedgehog (IHH) gene causing brachydactyly type A1 and evidence for a third locus. *Journal of Medical Genetics*, *40*(1), 42-44. <https://doi.org/10.1136/jmg.40.1.42>
- Kobayashi, T., & Dynlacht, B. D. (2011). Regulating the transition from centriole to basal body. *Journal of Cell Biology*, *193*(3), 435-444.
- Kobayashi, T., Soegiarto, D. W., Yang, Y., Lanske, B., Schipani, E., McMahon, A. P., & Kronenberg, H. M. (2005). Indian hedgehog stimulates periarticular chondrocyte differentiation to regulate growth plate length independently of PTHrP. *The Journal of clinical investigation*, *115*(7), 1734-1742.
- Kolupaeva, V., Daempfling, L., & Basilico, C. (2013). The B55 $\alpha$  regulatory subunit of protein phosphatase 2A mediates fibroblast growth factor-induced p107 dephosphorylation and growth arrest in chondrocytes. *Molecular and Cellular Biology*, *33*(15), 2865-2878.

- Kolupaeva, V., Laplantine, E., & Basilico, C. (2008). PP2A-mediated dephosphorylation of p107 plays a critical role in chondrocyte cell cycle arrest by FGF. *PLoS One*, *3*(10), e3447.
- Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y.-S., Ueno, I., Sakamoto, A., & Tong, K. I. (2010). The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nature cell biology*, *12*(3), 213-223.
- Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y., Ueno, T., Hara, T., Mizushima, N., Iwata, J., Ezaki, J., & Murata, S. (2007). Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*, *131*(6), 1149-1163.
- Komori, T. (2020). Molecular mechanism of Runx2-dependent bone development. *Molecules and cells*, *43*(2), 168.
- Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R., Gao, Y.-H., & Inada, M. (1997). Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *cell*, *89*(5), 755-764.
- Kouhara, H., Hadari, Y., Spivak-Kroizman, T., Schilling, J., Bar-Sagi, D., Lax, I., & Schlessinger, J. (1997). A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell*, *89*(5), 693-702.
- Kozhemyakina, E., Cohen, T., Yao, T.-P., & Lassar, A. B. (2009). Parathyroid hormone-related peptide represses chondrocyte hypertrophy through a protein phosphatase 2A/histone deacetylase 4/MEF2 pathway. *Molecular and cellular biology*, *29*(21), 5751-5762.
- Kozhemyakina, E., Lassar, A. B., & Zelzer, E. (2015). A pathway to bone: signaling molecules and transcription factors involved in chondrocyte development and maturation. *Development*, *142*(5), 817-831.
- Kozziel, L., Wuelling, M., Schneider, S., & Vortkamp, A. (2005). *Gli3 acts as a repressor downstream of Ihh in regulating two distinct steps of chondrocyte differentiation*. *Development (Cambridge, England)*, *132*(23), 5249-5260.
- Krejci, P. (2014). The paradox of FGFR3 signaling in skeletal dysplasia: why chondrocytes growth arrest while other cells over proliferate. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *759*, 40-48.
- Krejci, P., Krakow, D., Mekikian, P. B., & Wilcox, W. R. (2007). Fibroblast growth factors 1, 2, 17, and 19 are the predominant FGF ligands expressed in human fetal growth plate cartilage. *Pediatric research*, *61*(3), 267-272.
- Krock, B. L., Mills-Henry, I., & Perkins, B. D. (2009). Retrograde intraflagellar transport by cytoplasmic dynein-2 is required for outer segment extension in vertebrate photoreceptors but not arrestin translocation. *Investigative ophthalmology & visual science*, *50*(11), 5463-5471.
- Kumar, D., & Lassar, A. B. (2009). The transcriptional activity of Sox9 in chondrocytes is regulated by RhoA signaling and actin polymerization. *Molecular and cellular biology*, *29*(15), 4262-4273.
- Kumar, D., & Lassar, A. B. (2014). Fibroblast growth factor maintains chondrogenic potential of limb bud mesenchymal cells by modulating DNMT3A recruitment. *Cell reports*, *8*(5), 1419-1431.
- Kunova Bosakova, M., Nita, A., Gregor, T., Varecha, M., Gudernova, I., Fafilek, B., Barta, T., Basheer, N., Abraham, S. P., Balek, L., Tomanova, M., Fialova Kucerova, J., Bosak, J., Potesil, D., Zieba, J., Song, J., Konik, P., Park, S., Duran, I., ... Krejci, P. (2019). Fibroblast growth factor receptor influences primary cilium length through an interaction with intestinal cell kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(10), 4316-4325.
- Kurimchak, A., Haines, D. S., Garriga, J., Wu, S., De Luca, F., Sweredoski, M. J., Deshaies, R. J., Hess, S., & Graña, X. (2013). Activation of p107 by fibroblast growth factor, which is essential for chondrocyte cell cycle exit, is mediated by the protein phosphatase 2A/B55 $\alpha$  holoenzyme. *Molecular and Cellular Biology*, *33*(16), 3330-3342.
- Laizé, V., Martel, P., Viegas, C. S. B., Price, P. A., & Cancela, M. L. (2005). Evolution of Matrix and Bone  $\gamma$ -Carboxyglutamic Acid Proteins in Vertebrates \*. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(29), 26659-26668.
- Lamothe, B., Yamada, M., Schaeper, U., Birchmeier, W., Lax, I., & Schlessinger, J. (2004). The docking protein Gab1 is an essential component of an indirect mechanism for fibroblast growth factor stimulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt antiapoptotic pathway. *Molecular and cellular biology*, *24*(13), 5657-5666.
- Lanske, B., Karaplis, A. C., Lee, K., Luz, A., Vortkamp, A., Pirro, A., Karperien, M., Defize, L. H., Ho, C., & Mulligan, R. C. (1996). PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog—regulated bone growth. *Science*, *273*(5275), 663-666.
- Laplantine, E., Rossi, F., Sahni, M., Basilico, C., & Cobrinik, D. (2002). FGF signaling targets the pRb-related p107 and p130 proteins to induce chondrocyte growth arrest. *The Journal of cell biology*, *158*(4), 741-750.
- Lau, A., Wang, X.-J., Zhao, F., Villeneuve, N. F., Wu, T., Jiang, T., Sun, Z., White, E., & Zhang, D. D. (2010). A noncanonical mechanism of Nrf2 activation by autophagy deficiency: direct interaction between Keap1 and p62. *Molecular and cellular biology*, *30*(13), 3275-3285.
- Laurent, C., Marano, A., Baldit, A., Ferrari, M., Perrin, J.-C., Perroud, O., Bianchi, A., & Kempf, H. (2022). A preliminary study exploring the mechanical properties of normal and Mgp-deficient mouse femurs during early growth. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, *236*(8), 1106-1117.

- Lazarus, J. E., Hegde, A., Andrade, A. C., Nilsson, O., & Baron, J. (2007). Fibroblast growth factor expression in the postnatal growth plate. *Bone*, *40*(3), 577-586.
- Le Goff, C., Mahaut, C., Abhyankar, A., Le Goff, W., Serre, V., Afenjar, A., Destrée, A., Di Rocco, M., Héron, D., & Jacquemont, S. (2012). Mutations at a single codon in Mad homology 2 domain of SMAD4 cause Myhre syndrome. *Nature genetics*, *44*(1), 85-88.
- Lee, I. H., & Finkel, T. (2009). Regulation of autophagy by the p300 acetyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(10), 6322-6328.
- Lee, K., Lanske, B., Karaplis, A. C., Deeds, J. D., Kohno, H., Nissenson, R. A., Kronenberg, H. M., & Segre, G. V. (1996). Parathyroid hormone-related peptide delays terminal differentiation of chondrocytes during endochondral bone development. *Endocrinology*, *137*(11), 5109-5118.
- Lee, N. K., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J. D., Confavreux, C., Dacquin, R., Mee, P. J., McKee, M. D., Jung, D. Y., Zhang, Z., Kim, J. K., Mauvais-Jarvis, F., Ducy, P., & Karsenty, G. (2007). Endocrine Regulation of Energy Metabolism by the Skeleton. *Cell*, *130*(3), 456-469.
- Lee, S. J., Jeong, J. Y., Oh, C. J., Park, S., Kim, J.-Y., Kim, H.-J., Doo Kim, N., Choi, Y.-K., Do, J.-Y., Go, Y., Ha, C.-M., Choi, J.-Y., Huh, S., Ho Jeoung, N., Lee, K.-U., Choi, H.-S., Wang, Y., Park, K.-G., Harris, R. A., & Lee, I.-K. (2015). Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4 Promotes Vascular Calcification via SMAD1/5/8 Phosphorylation. *Scientific Reports*, *5*(1), 16577.
- Lee, S. J., Lee, I.-K., & Jeon, J.-H. (2020). Vascular Calcification—New Insights into Its Mechanism. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(8), 2685.
- Lee, Y.-J., Park, S.-Y., Lee, S.-J., Boo, Y. C., Choi, J.-Y., & Kim, J.-E. (2015). Ucmr, a direct transcriptional target of Runx2 and Osterix, promotes osteoblast differentiation and nodule formation. *Osteoarthritis and Cartilage*, *23*(8), 1421-1431.
- Lefebvre, V. (2019). Roles and regulation of SOX transcription factors in skeletogenesis. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 133, p. 171-193). Elsevier.
- Lefebvre, V., Angelozzi, M., & Haseeb, A. (2019). SOX9 in cartilage development and disease. *Current Opinion in Cell Biology*, *61*, 39-47.
- Lefebvre, V., & Bhattaram, P. (2010). Vertebrate Skeletogenesis. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 90, p. 291-317). Elsevier.
- Lefebvre, V., Li, P., & De Crombrughe, B. (1998). A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *The EMBO journal*, *17*(19), 5718-5733.
- Lefebvre, V., & Smits, P. (2005). Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, *75*(3), 200-212.
- Legeai-Mallet, L., Benoist-Lassel, C., Munnich, A., & Bonaventure, J. (2004). Overexpression of FGFR3, Stat1, Stat5 and p21Cip1 correlates with phenotypic severity and defective chondrocyte differentiation in FGFR3-related chondrodysplasias. *Bone*, *34*(1), 26-36.
- Leitinger, B. (2014). Discoidin domain receptor functions in physiological and pathological conditions. *International review of cell and molecular biology*, *310*, 39-87.
- Leroux-Berger, M., Queguiner, I., Maciel, T. T., Ho, A., Relaix, F., & Kempf, H. (2011). Pathologic calcification of adult vascular smooth muscle cells differs on their crest or mesodermal embryonic origin. *Journal of Bone and Mineral Research*, *26*(7), 1543-1553.
- Leung, V. Y., Gao, B., Leung, K. K., Melhado, I. G., Wynn, S. L., Au, T. Y., Dung, N. W., Lau, J. Y., Mak, A. C., & Chan, D. (2011). SOX9 governs differentiation stage-specific gene expression in growth plate chondrocytes via direct concomitant transactivation and repression. *PLoS genetics*, *7*(11), e1002356.
- Li, C., Chen, L., Iwata, T., Kitagawa, M., Fu, X.-Y., & Deng, C.-X. (1999). A Lys644Glu substitution in fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) causes dwarfism in mice by activation of STATs and ink4 cell cycle inhibitors. *Human molecular genetics*, *8*(1), 35-44.
- Li, C., Li, J., He, F., Li, K., Li, X., & Zhang, Y. (2020). Matrix Gla protein regulates adipogenesis and is serum marker of visceral adiposity. *Adipocyte*, *9*(1), 68-76.
- Li, M., Seki, Y., Freitas, P. H., Nagata, M., Kojima, T., Sultana, S., Ubaidus, S., Maeda, T., Shimomura, J., & Henderson, J. E. (2010). FGFR3 down-regulates PTH/PTHrP receptor gene expression by mediating JAK/STAT signaling in chondrocytic cell line. *Journal of electron microscopy*, *59*(3), 227-236.
- Li, X., Wang, C., Xiao, J., McKeehan, W. L., & Wang, F. (2016). Fibroblast growth factors, old kids on the new block. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *53*, 155-167.
- Li, X., Yang, S., Yuan, G., Jing, D., Qin, L., Zhao, H., & Yang, S. (2022). Type II collagen-positive progenitors are important stem cells in controlling skeletal development and vascular formation. *Bone Research*, *10*(1).

- Li, Y., Hu, Z., Chen, B., Bu, Q., Lu, W., Deng, Y., Zhu, R., Shao, X., Hou, J., & Zhao, J. (2012). Taurine attenuates methamphetamine-induced autophagy and apoptosis in PC12 cells through mTOR signaling pathway. *Toxicology letters*, *215*(1), 1-7.
- Li, Y., Shan, Z., Teng, W., Yu, X., Li, Y., Fan, C., Teng, X., Guo, R., Wang, H., & Li, J. (2010). Abnormalities of maternal thyroid function during pregnancy affect neuropsychological development of their children at 25–30 months. *Clinical endocrinology*, *72*(6), 825-829.
- Liang, X. H., Kleeman, L. K., Jiang, H. H., Gordon, G., Goldman, J. E., Berry, G., Herman, B., & Levine, B. (1998). Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *Journal of virology*, *72*(11), 8586-8596.
- Lin, A. C., Seeto, B. L., Bartoszko, J. M., Khoury, M. A., Whetstone, H., Ho, L., Hsu, C., Ali, S. A., & Alman, B. A. (2009). Modulating hedgehog signaling can attenuate the severity of osteoarthritis. *Nature medicine*, *15*(12), 1421-1425.
- Lin, M.-E., Chen, T., Leaf, E. M., Speer, M. Y., & Giachelli, C. M. (2015). Runx2 Expression in Smooth Muscle Cells Is Required for Arterial Medial Calcification in Mice. *The American Journal of Pathology*, *185*(7), 1958-1969. h
- Lindy, A. S., Basehore, M. J., Munisha, M., Williams, A. L., Friez, M. J., Writzl, K., Willems, P., & Dougan, S. T. (2016). Identification of a novel insertion mutation in FGFR3 that causes thanatophoric dysplasia type 1. *American Journal of Medical Genetics Part A*, *170*(6), 1573-1579.
- Liu, C., Liu, H., & Xie, T. (2022). Impact of Fetuin-A, Lp(a), matrix gla protein and macrophage density on calcific aortic valve disease: a clinical study. *Lipids in Health and Disease*, *21*(1).
- Liu, Z., Lavine, K. J., Hung, I. H., & Ornitz, D. M. (2007). FGF18 is required for early chondrocyte proliferation, hypertrophy and vascular invasion of the growth plate. *Developmental biology*, *302*(1), 80-91.
- Liu, Z., Xu, J., Colvin, J. S., & Ornitz, D. M. (2002). Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by fibroblast growth factor 18. *Genes & development*, *16*(7), 859-869.
- Loeser, R. F., Olex, A. L., McNulty, M. A., Carlson, C. S., Callahan, M. F., Ferguson, C. M., Chou, J., Leng, X., & Fetrow, J. S. (2012). Microarray analysis reveals age-related differences in gene expression during the development of osteoarthritis in mice. *Arthritis & Rheumatism*, *64*(3), 705-717.
- Long, F., Zhang, X. M., Karp, S., Yang, Y., & McMahon, A. P. (2001). *Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation.*
- Loshkajian, A., Roume, J., Stanescu, V., Delezoide, A., Stampf, F., & Maroteaux, P. (1997). Familial blomstrand chondrodysplasia with advanced skeletal maturation: Further delineation. *American Journal of Medical Genetics*, *71*(3), 283-288.
- Luo, G., D'Souza, R., Hogue, D., & Karsenty, G. (1995). The matrix Gla protein gene is a marker of the chondrogenesis cell lineage during mouse development. *Journal of Bone and Mineral Research*, *10*(2), 325-334.
- Luo, G., Ducy, P., McKee, M. D., Pinero, G. J., Loyer, E., Behringer, R. R., & Karsenty, G. (1997). Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*, *386*(6620), 78-81.
- Mackie, E. J., Tatarczuch, L., & Mirams, M. (2011). The skeleton: a multi-functional complex organ. The growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *Journal of Endocrinology*, *211*(2), 109-121.
- Malemud, C. J. (2015). The biological basis of osteoarthritis: State of the evidence. *Current opinion in rheumatology*, *27*(3), 289.
- Malhotra, R., Burke, M. F., Martyn, T., Shakartzi, H. R., Thayer, T. E., O'Rourke, C., Li, P., Derwall, M., Spagnolli, E., Kolodziej, S. A., Hoeft, K., Mayeur, C., Jiramongkolchai, P., Kumar, R., Buys, E. S., Yu, P. B., Bloch, K. D., & Bloch, D. B. (2015). Inhibition of Bone Morphogenetic Protein Signal Transduction Prevents the Medial Vascular Calcification Associated with Matrix Gla Protein Deficiency. *PLOS ONE*, *10*(1), e0117098.
- Mancilla, E. E., De Luca, F., Uyeda, J. A., Czerwiec, F. S., & Baron, J. (1998). Effects of fibroblast growth factor-2 on longitudinal bone growth. *Endocrinology*, *139*(6), 2900-2904.
- Manickam, K., Donoghue, D. J., Meyer, A. N., Snyder, P. J., & Prior, T. W. (2014). Suppression of severe achondroplasia with developmental delay and acanthosis nigricans by the p. Thr651Pro mutation. *American Journal of Medical Genetics Part A*, *164*(1), 243-250.
- Manning, J. E., Goldin, J. G., Shpiner, R. B., & Aberle, D. R. (1998). Case report: tracheobronchopathia osteochondroplastica. *Clinical Radiology*, *53*(4), 302-304.
- Mansfield, J. C., Mandalia, V., Toms, A., Winlove, C. P., & Brasselet, S. (2019). Collagen reorganization in cartilage under strain probed by polarization sensitive second harmonic generation microscopy. *Journal of The Royal Society Interface*, *16*(150), 20180611.
- Maria Fimia, G., Stoykova, A., Romagnoli, A., Giunta, L., Di Bartolomeo, S., Nardacci, R., Corazzari, M., Fuoco, C., Ucar, A., & Schwartz, P. (2007). Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature*, *447*(7148), 1121-1125.

- Marshall, W. F. (2007). What is the function of centrioles? *Journal of cellular biochemistry*, *100*(4), 916-922.
- Martin, L., Kaci, N., Benoist-Lasselín, C., Mondolóni, M., Decaudaveine, S., Estibals, V., Cornille, M., Loisy, L., Flipo, J., Demuyñck, B., de la Luz Cádiz-Gurrea, M., Barbault, F., Fernández-Arroyo, S., Schibler, L., Segura-Carretero, A., Dambroise, E., & Legeai-Mallet, L. (2022). Theobroma cacao improves bone growth by modulating defective ciliogenesis in a mouse model of achondroplasia. *Bone Research*, *10*(1).
- Martin, L., Kaci, N., Estibals, V., Goudin, N., Garfa-Traore, M., Benoist-Lasselín, C., Dambroise, E., & Legeai-Mallet, L. (2018). Constitutively active FGFR3 disrupts primary cilium length and IFT20 trafficking in various chondrocyte models of achondroplasia. *Human molecular genetics*, *27*(1), 1-13.
- Marulanda, J., Eimar, H., McKee, M. D., Berkvens, M., Nelea, V., Roman, H., Borrás, T., Tamimi, F., Ferron, M., & Murshed, M. (2017). Matrix Gla protein deficiency impairs nasal septum growth, causing midface hypoplasia. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(27), 11400-11412.
- Marulanda, J., Gao, C., Roman, H., Henderson, J. E., & Murshed, M. (2013). Prevention of arterial calcification corrects the low bone mass phenotype in MGP-deficient mice. *Bone*, *57*(2), 499-508.
- Marzella, L., Ahlberg, J., & Glaumann, H. (1981). Autophagy, heterophagy, microautophagy and crinophagy as the means for intracellular degradation. *Virchows Archiv. B, Cell pathology*
- Matsunaga, K., Saitoh, T., Tabata, K., Omori, H., Satoh, T., Kurotori, N., Maejima, I., Shirahama-Noda, K., Ichimura, T., & Isobe, T. (2009). Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nature cell biology*, *11*(4), 385-396.
- Matsushita, M., Kitoh, H., Kaneko, H., Mishima, K., Kadono, I., Ishiguro, N., & Nishimura, G. (2013). A novel SOX9 H169Q mutation in a family with overlapping phenotype of mild campomelic dysplasia and small patella syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, *161*(10), 2528-2534.
- McGlashan, S., Haycraft, C., Jensen, C., Yoder, B., & Poole, C. (2007). Articular cartilage and growth plate defects are associated with chondrocyte cytoskeletal abnormalities in Tg737orpk mice lacking the primary cilia protein polaris. *Matrix biology*, *26*(4), 234-246.
- McKee, R. W., Binkley, S. B., MacCorquodale, D. W., Thayer, S. A., & Doisy, E. A. (1939). THE ISOLATION OF VITAMINS K1 AND K2. *Journal of the American Chemical Society*, *61*(5), 1295-1295.
- McMahon, J. A., Takada, S., Zimmerman, L. B., Fan, C.-M., Harland, R. M., & McMahon, A. P. (1998). Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes & development*, *12*(10), 1438-1452.
- McNulty, M. A., Loeser, R. F., Davey, C., Callahan, M. F., Ferguson, C. M., & Carlson, C. S. (2011). A comprehensive histological assessment of osteoarthritis lesions in mice. *Cartilage*, *2*(4), 354-363.
- McNulty, M. A., Loeser, R. F., Davey, C., Callahan, M. F., Ferguson, C. M., & Carlson, C. S. (2012). Histopathology of naturally occurring and surgically induced osteoarthritis in mice. *Osteoarthritis and Cartilage*, *20*(8), 949-956.
- Mead, T. J., Wang, Q., Bhattaram, P., Dy, P., Afelik, S., Jensen, J., & Lefebvre, V. (2013). A far-upstream (- 70 kb) enhancer mediates Sox9 auto-regulation in somatic tissues during development and adult regeneration. *Nucleic acids research*, *41*(8), 4459-4469.
- Meier, M., Weng, L. P., Alexandrakis, E., Rüschoff, J., & Goeckenjan, G. (2001). Tracheobronchial stenosis in Keutel syndrome. *European Respiratory Journal*, *17*(3), 566.
- Mello, M. A., & Tuan, R. S. (1999). High density micromass cultures of embryonic limb bud mesenchymal cells: an in vitro model of endochondral skeletal development. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, *35*(5), 262-269.
- Mera, P., Laue, K., Wei, J., Berger, J. M., & Karsenty, G. (2016). Osteocalcin is necessary and sufficient to maintain muscle mass in older mice. *Molecular Metabolism*, *5*(10), 1042-1047.
- Minina, E., Kreschel, C., Naski, M. C., Ornitz, D. M., & Vortkamp, A. (2002). Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Developmental cell*, *3*(3), 439-449.
- Mishima, E., Ito, J., Wu, Z., Nakamura, T., Wahida, A., Doll, S., Tonnus, W., Nepachalovich, P., Eggenhofer, E., Aldrovandi, M., Henkelmann, B., Yamada, K., Wanninger, J., Zilka, O., Sato, E., Feederle, R., Hass, D., Maida, A., Mourão, A. S. D., ... Conrad, M. (2022). A non-canonical vitamin K cycle is a potent ferroptosis suppressor. *Nature*, *608*(7924), 778-783.
- Misra, D., Booth, S. L., Crosier, M. D., Ordovas, J. M., Felson, D. T., & Neogi, T. (2011a). Matrix Gla protein polymorphism, but not concentrations, is associated with radiographic hand osteoarthritis. *The Journal of rheumatology*, *38*(9), 1960-1965.
- Misra, D., Booth, S. L., Crosier, M. D., Ordovas, J. M., Felson, D. T., & Neogi, T. (2011b). Matrix Gla Protein Polymorphism, But Not Concentrations, Is Associated with Radiographic Hand Osteoarthritis. *The Journal of Rheumatology*, *38*(9), 1960-1965.
- Misra, D., Booth, S. L., Tolstykh, I., Felson, D. T., Nevitt, M. C., Lewis, C. E., Torner, J., & Neogi, T. (2013). Vitamin K deficiency is associated with incident knee osteoarthritis. *The American journal of medicine*, *126*(3), 243-248.

- Miyamoto, T., Hosoba, K., Ochiai, H., Royba, E., Izumi, H., Sakuma, T., Yamamoto, T., Dynlacht, B. D., & Matsuura, S. (2015a). The microtubule-depolymerizing activity of a mitotic kinesin protein KIF2A drives primary cilia disassembly coupled with cell proliferation. *Cell reports*, *10*(5), 664-673.
- Miyamoto, T., Hosoba, K., Ochiai, H., Royba, E., Izumi, H., Sakuma, T., Yamamoto, T., Dynlacht, B. D., & Matsuura, S. (2015b). The Microtubule-Depolymerizing Activity of a Mitotic Kinesin Protein KIF2A Drives Primary Cilia Disassembly Coupled with Cell Proliferation. *Cell Reports*, *10*(5), 664-673.
- Mizushima, N., & Klionsky, D. J. (2007). Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annual review of nutrition*, *27*(1), 19-40.
- Mizushima, N., Kuma, A., Kobayashi, Y., Yamamoto, A., Matsubae, M., Takao, T., Natsume, T., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2003). Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *Journal of Cell Science*, *116*(9), 1679-1688.
- Moe, S. M., Duan, D., Doehle, B. P., O'Neill, K. D., & Chen, N. X. (2003). Uremia induces the osteoblast differentiation factor *Cbfa1* in human blood vessels. *Kidney International*, *63*(3), 1003-1011.
- Moe, S. M., O'Neill, K. D., Duan, D., Ahmed, S., Chen, N. X., Leapman, S. B., Fineberg, N., & Kopecky, K. (2002). Medial artery calcification in ESRD patients is associated with deposition of bone matrix proteins. *Kidney International*, *61*(2), 638-647.
- Moffatt, P., Ben Amor, M., Glorieux, F. H., Roschger, P., Klaushofer, K., Schwartzenuber, J. A., Paterson, A. D., Hu, P., Marshall, C., Fahiminiya, S., Majewski, J., Beaulieu, C. L., Boycott, K. M., & Rauch, F. (2013). Metaphyseal Dysplasia with Maxillary Hypoplasia and Brachydactyly Is Caused by a Duplication in *RUNX2*. *The American Journal of Human Genetics*, *92*(2), 252-258.
- Mohamed, F. F., Ge, C., Cowling, R. T., Lucas, D., Hallett, S. A., Ono, N., Binrayes, A.-A., Greenberg, B., & Franceschi, R. T. (2022). The collagen receptor, discoidin domain receptor 2, functions in Gli1-positive skeletal progenitors and chondrocytes to control bone development. *Bone research*, *10*(1), 1-17.
- Mohammadi, M., Dionne, C., Li, W., Li, N., Spivak, T., Honegger, A., Jaye, M., & Schlessinger, J. (1992). Point mutation in FGF receptor eliminates phosphatidylinositol hydrolysis without affecting mitogenesis. *Nature*, *358*(6388), 681-684.
- Monastyrska, I., Rieter, E., Klionsky, D. J., & Reggiori, F. (2009). Multiple roles of the cytoskeleton in autophagy. *Biological Reviews*, *84*(3), 431-448.
- Moncada, R. M., Venta, L. A., Venta, E. R., Fareed, J., Walenga, J. M., & Messmore, H. L. (1992). Tracheal and bronchial cartilaginous rings: warfarin sodium-induced calcification. *Radiology*, *184*(2), 437-439.
- Montaño, A. M., Lock-Hock, N., Steiner, R. D., Graham, B. H., Szlago, M., Greenstein, R., Pineda, M., Gonzalez-Meneses, A., Çoker, M., Bartholomew, D., Sands, M. S., Wang, R., Giugliani, R., Macaya, A., Pastores, G., Ketko, A. K., Ezgü, F., Tanaka, A., Arash, L., ... Sly, W. S. (2016). Clinical course of sly syndrome (mucopolysaccharidosis type VII). *Journal of Medical Genetics*, *53*(6), 403-418.
- Montesano, R., Vassalli, J.-D., Baird, A., Guillemin, R., & Orci, L. (1986). Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *83*(19), 7297-7301.
- Moore, E., Bendele, A., Thompson, D., Littau, A., Waggie, K., Reardon, B., & Ellsworth, J. (2005). Fibroblast growth factor-18 stimulates chondrogenesis and cartilage repair in a rat model of injury-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage*, *13*(7), 623-631.
- Moore, E. R., & Jacobs, C. R. (2017). The primary cilium as a signaling nexus for growth plate function and subsequent skeletal development: CILIA IN GROWTH PLATE SIGNALING. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, *36*(2), 533-545.
- Moscat, J., & Diaz-Meco, M. T. (2009). p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell*, *137*(6), 1001-1004.
- Moss, J. J., Wirth, M., Tooze, S. A., Lane, J. D., & Hammond, C. L. (2021). Autophagy coordinates chondrocyte development and early joint formation in zebrafish. *The FASEB Journal*, *35*(11), e22002
- Mueller, M. B., & Tuan, R. S. (2008). Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Arthritis & Rheumatism*, *58*(5), 1377-1388.
- Muhammad, H., Rais, Y., Miosge, N., & Ornan, E. M. (2012). The primary cilium as a dual sensor of mechanochemical signals in chondrocytes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *69*(13), 2101-2107.
- Munroe, P. B., Olgunturk, R. O., Fryns, J.-P., Maldergem, L. V., Ziereisen, F., Yuksel, B., Gardiner, R. M., & Chung, E. (1999). Mutations in the gene encoding the human matrix Gla protein cause Keutel syndrome. *Nature Genetics*, *21*(1), 142-144.
- Murakami, S., Balmes, G., McKinney, S., Zhang, Z., Givol, D., & de Crombrughe, B. (2004). Constitutive activation of MEK1 in chondrocytes causes Stat1-independent achondroplasia-like dwarfism and rescues the *Fgfr3*-deficient mouse phenotype. *Genes & development*, *18*(3), 290-305.

- Murakami, S., Kan, M., McKeenan, W. L., & De Crombrughe, B. (2000). Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(3), 1113-1118.
- Murshed, M., Schinke, T., McKee, M. D., & Karsenty, G. (2004). Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *The Journal of cell biology*, 165(5), 625-630.
- Murtaugh, L. C., Zeng, L., Chyung, J. H., & Lassar, A. B. (2001). The chick transcriptional repressor Nkx3. 2 acts downstream of Shh to promote BMP-dependent axial chondrogenesis. *Developmental cell*, 1(3), 411-422.
- Muruganandan, S., Pierce, R., Teguh, D. A., Perez, R. F., Bell, N., Nguyen, B., Hohl, K., Snyder, B. D., Grinstaff, M. W., Alberico, H., Woods, D., Kong, Y., Sima, C., Bhagat, S., Ho, K., Rosen, V., Gamer, L., & Ionescu, A. M. (2022). A FoxA2+ long-term stem cell population is necessary for growth plate cartilage regeneration after injury. *Nature Communications*, 13(1).
- Nakamura, E., Hata, K., Takahata, Y., Kurosaka, H., Abe, M., Abe, T., Kihara, M., Komori, T., Kobayashi, S., Murakami, T., Inubushi, T., Yamashiro, T., Yamamoto, S., Akiyama, H., Kawaguchi, M., Sakata, N., & Nishimura, R. (2021). Zfh4 regulates endochondral ossification as the transcriptional platform of Osterix in mice. *Communications Biology*, 4(1).
- Nakase, T., Miyaji, T., Tomita, T., Kaneko, M., Kuriyama, K., Myoui, A., Sugamoto, K., Ochi, T., & Yoshikawa, H. (2003). Localization of bone morphogenetic protein-2 in human osteoarthritic cartilage and osteophyte. *Osteoarthritis and Cartilage*, 11(4), 278-284.
- Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R., & De Crombrughe, B. (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 108(1), 17-29.
- Nanda, A., Anim, J. T., Al-Gareeb, M., & Alsaleh, Q. A. (2006). Keutel syndrome with overlapping features of cutis laxa: A new variant. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 140A(13), 1487-1489. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.31234>
- Naski, M. C., Colvin, J. S., Coffin, J. D., & Ornitz, D. M. (1998). Repression of hedgehog signaling and BMP4 expression in growth plate cartilage by fibroblast growth factor receptor 3. *Development*, 125(24), 4977-4988.
- Neacsu, C. D., Grosch, M., Tejada, M., Winterpacht, A., Paulsson, M., Wagener, R., & Tagariello, A. (2011). Ucma (Grp-2) is required for zebrafish skeletal development. Evidence for a functional role of its glutamate  $\gamma$ -carboxylation. *Matrix Biology*, 30(7), 369-378.
- Neogi, T., Felton, D. T., Sarno, R., & Booth, S. L. (2008). Vitamin K in hand osteoarthritis: results from a randomised clinical trial. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 67(11), 1570-1573.
- Newman, B., Gigout, L. I., Sudre, L., Grant, M. E., & Wallis, G. A. (2001). Coordinated expression of matrix Gla protein is required during endochondral ossification for chondrocyte survival. *Journal of Cell Biology*, 154(3), 659-666. <https://doi.org/10.1083/jcb.200106040>
- Newton, P. T., Li, L., Zhou, B., Schweingruber, C., Hovorakova, M., Xie, M., Sun, X., Sandhow, L., Artemov, A. V., & Ivashkin, E. (2019). A radical switch in clonality reveals a stem cell niche in the epiphyseal growth plate. *Nature*, 567(7747), 234-238.
- Nishimoto, S. K., & Nishimoto, M. (2014). Matrix Gla Protein Binds to Fibronectin and Enhances Cell Attachment and Spreading on Fibronectin. *International Journal of Cell Biology*, 2014, 1-13.
- Nishimura, R., Wakabayashi, M., Hata, K., Matsubara, T., Honma, S., Wakisaka, S., Kiyonari, H., Shioi, G., Yamaguchi, A., & Tsumaki, N. (2012). Osterix regulates calcification and degradation of chondrogenic matrices through matrix metalloproteinase 13 (MMP13) expression in association with transcription factor Runx2 during endochondral ossification. *Journal of Biological Chemistry*, 287(40), 33179-33190.
- Oh, J.-H., Park, S.-Y., de Crombrughe, B., & Kim, J.-E. (2012). Chondrocyte-specific ablation of Osterix leads to impaired endochondral ossification. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 418(4), 634-640. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.01.064>
- Ohbayashi, N., Shibayama, M., Kurotaki, Y., Imanishi, M., Fujimori, T., Itoh, N., & Takada, S. (2002). FGF18 is required for normal cell proliferation and differentiation during osteogenesis and chondrogenesis. *Genes & development*, 16(7), 870-879.
- Ohsumi, Y. (2001). Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2(3), 211-216.
- Okuyan, H. M., Terzi, M. Y., Karaboğa, İ., Doğan, S., & Kalacı, A. (2020). In vivo protective effects of upper zone of growth plate and cartilage matrix associated protein against cartilage degeneration in a monosodium iodoacetate induced osteoarthritis model. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 98(11), 763-770.
- Opperman, L. A. (2000). Cranial sutures as intramembranous bone growth sites. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 219(4), 472-485.

- Ornitz, D. M., & Itoh, N. (2015). The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *WIREs Developmental Biology*, 4(3), 215-266.
- Ornitz, D. M., & Legeai-Mallet, L. (2017). Achondroplasia: Development, pathogenesis, and therapy. *Developmental dynamics*, 246(4), 291-309.
- Ornitz, D. M., & Marie, P. J. (2002). FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes & Development*, 16(12), 1446-1465.
- Ornitz, D. M., & Marie, P. J. (2015). Fibroblast growth factor signaling in skeletal development and disease. *Genes & Development*, 29(14), 1463-1486.
- Otawara, Y., & Price, P. A. (1986). Developmental appearance of matrix GLA protein during calcification in the rat. *Journal of Biological Chemistry*, 261(23), 10828-10832.
- Oury, F., Khiriani, L., Denny, C. A., Gardin, A., Chamouni, A., Goeden, N., Huang, Y., Lee, H., Srinivas, P., Gao, X.-B., Suyama, S., Langer, T., Mann, John. J., Horvath, T. L., Bonnin, A., & Karsenty, G. (2013). Maternal and Offspring Pools of Osteocalcin Influence Brain Development and Functions. *Cell*, 155(1), 228-241.
- Ovchinnikov, D. (2009). Alcian Blue/Alizarin Red Staining of Cartilage and Bone in Mouse. *Cold Spring Harbor protocols*, 2009, pdb.prot5170.
- O'Young, J., Liao, Y., Xiao, Y., Jalkanen, J., Lajoie, G., Karttunen, M., Goldberg, H. A., & Hunter, G. K. (2011). Matrix Gla Protein Inhibits Ectopic Calcification by a Direct Interaction with Hydroxyapatite Crystals. *Journal of the American Chemical Society*, 133(45), 18406-18412
- Ozdemir, N., Ersu, R., Akalin, F., Karadag, B., Kut, A., Karakoc, F., Elçioglu, N., & DaGli, E. (2006). Tracheobronchial calcification associated with Keutel syndrome. *The Turkish journal of pediatrics*, 48, 357-361.
- Pablo, J. L., DeCaen, P. G., & Clapham, D. E. (2017). Progress in ciliary ion channel physiology. *Journal of General Physiology*, 149(1), 37-47.
- Paces-Fessy, M., Boucher, D., Petit, E., Paute-Briand, S., & Blanchet-Tournier, M.-F. (2004). The negative regulator of Gli, Suppressor of fused (Sufu), interacts with SAP18, Galectin3 and other nuclear proteins. *Biochemical Journal*, 378(2), 353-362.
- Pala, R., Alomari, N., & Nauli, S. M. (2017). Primary cilium-dependent signaling mechanisms. *International journal of molecular sciences*, 18(11), 2272.
- Pampliega, O., Orhon, I., Patel, B., Sridhar, S., Díaz-Carretero, A., Beau, I., Codogno, P., Satir, B. H., Satir, P., & Cuervo, A. M. (2013). Functional interaction between autophagy and ciliogenesis. *Nature*, 502(7470), 194-200.
- Pan, L. C., & Price, P. A. (1985). The propeptide of rat bone gamma-carboxyglutamic acid protein shares homology with other vitamin K-dependent protein precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(18), 6109-6113.
- Pannier, S., Mugniery, E., Jonquoy, A., Benoist-Lasselín, C., Odent, T., Jais, J.-P., Munnich, A., & Legeai-Mallet, L. (2010). Delayed bone age due to a dual effect of FGFR3 mutation in Achondroplasia. *Bone*, 47(5), 905-915.
- Parashar, A., Bak, K., & Murshed, M. (2022). Prevention of Arterial Elastocalcinosis : Differential Roles of the Conserved Glutamic Acid and Serine Residues of Matrix Gla Protein. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 42(6), e155-e167.
- Parashar, A., Gourgas, O., Lau, K., Li, J., Muiznieks, L., Sharpe, S., Davis, E., Cerruti, M., & Murshed, M. (2021). Elastin calcification in in vitro models and its prevention by MGP's N-terminal peptide. *Journal of Structural Biology*, 213(1), 107637.
- Paridaen, J. T., Wilsch-Bräuninger, M., & Huttner, W. B. (2013). Asymmetric inheritance of centrosome-associated primary cilium membrane directs ciliogenesis after cell division. *Cell*, 155(2), 333-344.
- Park, J. H., Park, B. H., Kim, H. K., Park, T. S., & Baek, H. S. (2002). Hypoxia decreases Runx2/Cbfa1 expression in human osteoblast-like cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 192(1), 197-203.
- Park, S. M., Jang, H. J., & Lee, J. H. (2019). Roles of primary cilia in the developing brain. *Frontiers in cellular neuroscience*, 13, 218.
- Parker, C. H., Morgan, C. R., Rand, K. D., Engen, J. R., Jorgenson, J. W., & Stafford, D. W. (2014). A Conformational Investigation of Propeptide Binding to the Integral Membrane Protein  $\gamma$ -Glutamyl Carboxylase Using Nanodisc Hydrogen Exchange Mass Spectrometry. *Biochemistry*, 53(9), 1511-1520.
- Parzych, K. R., & Klionsky, D. J. (2014). An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants & redox signaling*, 20(3), 460-473.
- Patel, S., Singh, R., Preuss, C. V., & Patel, N. (2022). *Warfarin* (29261922). In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Patti, A., Gennari, L., Merlotti, D., Dotta, F., & Nuti, R. (2013). Endocrine Actions of Osteocalcin. *International Journal of Endocrinology*, 2013, 846480.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M. D., & Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 122(6), 927-939.

- Pedersen, L. B., & Rosenbaum, J. L. (2008). Chapter Two Intraflagellar Transport (IFT): Role in Ciliary Assembly, Resorption and Signalling. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 85, p. 23-61). Academic Press.
- Pedersen, L. B., Veland, I. R., Schrøder, J. M., & Christensen, S. T. (2008). Assembly of primary cilia. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 237(8), 1993-2006.
- Pelz, H.-J., Rost, S., Hünenberg, M., Fregin, A., Heiberg, A.-C., Baert, K., MacNicoll, A. D., Prescott, C. V., Walker, A.-S., Oldenburg, J., & Müller, C. R. (2005). The Genetic Basis of Resistance to Anticoagulants in Rodents. *Genetics*, 170(4), 1839-1847.
- Percival, C. J., & Richtsmeier, J. T. (2013). Angiogenesis and intramembranous osteogenesis. *Developmental Dynamics*, 242(8), 909-922.
- Perrone, E., Chen, K., Ramos, M., Milanezi, M. F., Nakano, V., Falconi, A., Silva, J., Campos, J., Silva, C. M. C., Filho, J. B. O., & Perez, A. B. A. (2018). A Novel MGP Gene Mutation Causing Keutel Syndrome in a Brazilian Patient. *Molecular Syndromology*, 9(3), 159-163.
- Peters, K. G., Marie, J., Wilson, E., Ives, H. E., Escobedo, J., Rosario, M. D., Mirda, D., & Williams, L. T. (1992). Point mutation of an FGF receptor abolishes phosphatidylinositol turnover and Ca<sup>2+</sup> flux but not mitogenesis. *Nature*, 358(6388), 678-681.
- Prevo, B., Scholey, J. M., & Peterman, E. J. G. (2017). Intraflagellar transport: mechanisms of motor action, cooperation, and cargo delivery. *The FEBS Journal*, 284(18), 2905-2931.
- Price, P. A., Caputo, J. M., & Williamson, M. K. (2002). Bone origin of the serum complex of calcium, phosphate, fetuin, and matrix Gla protein: Biochemical evidence for the cancellous bone-remodeling compartment. *Journal of bone and mineral research*, 17(7), 1171-1179.
- Price, P. A., Faus, S. A., & Williamson, M. K. (1998). Warfarin Causes Rapid Calcification of the Elastic Lamellae in Rat Arteries and Heart Valves. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1400
- Price, P. A., Faus, S. A., & Williamson, M. K. (2001). Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 21(5), 817-824.
- Price, P. A., Fraser, J. D., & Metz-Virca, G. (1987). Molecular cloning of matrix Gla protein: implications for substrate recognition by the vitamin K-dependent gamma-carboxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(23), 8335-8339.
- Price, P. A., June, H. H., Buckley, J. R., & Williamson, M. K. (2001). Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 21(10), 1610-1616.
- Price, P. A., Otsuka, A. A., Poser, J. W., Kristaponis, J., & Raman, N. (1976). Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(5), 1447-1451.
- Price, P. A., Rice, J. S., & Williamson, M. K. (1994). Conserved phosphorylation of serines in the Ser-X-Glu/Ser(P) sequences of the vitamin K-dependent matrix Gla protein from shark, lamb, rat, cow, and human. *Protein Science*, 3(5), 822-830.
- Price, P. A., & Urist, M. R. (1983). Aatrix gla protein, a new γ-carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone. *biochemical and biophysical research communications*, 117(3), 7.
- Price, P. A., & Williamson, M. K. (1985). Primary structure of bovine matrix Gla protein, a new vitamin K-dependent bone protein. *Journal of Biological Chemistry*, 260(28), 14971-14975.
- Prinos, P., Costa, T., Sommer, A., Kilpatrick, M. W., & Tsiouras, P. (1995). A common FGFR3 gene mutation in hypochondroplasia. *Human Molecular Genetics*, 4(11), 2097-2101.
- Priore, R., Dailey, L., & Basilico, C. (2006). Downregulation of Akt activity contributes to the growth arrest induced by FGF in chondrocytes. *Journal of cellular physiology*, 207(3), 800-808.
- Proudfoot, D., Skepper, J. N., Hegyi, L., Bennett, M. R., Shanahan, C. M., & Weissberg, P. L. (2000). Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro : Evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circulation research*, 87(11), 1055-1062.
- Provot, S., Kempf, H., Murtaugh, L. C., Chung, U., Kim, D.-W., Chyung, J., Kronenberg, H. M., & Lassar, A. B. (2006a). *Nkx3.2/Bapx1 acts as a negative regulator of chondrocyte maturation. Development (Cambridge, England)*, 133(4), 651-662.
- Provot, S., & Schipani, E. (2005). Molecular mechanisms of endochondral bone development. *Vertebrate Skeletal Biology*, 328(3)
- Pugacheva, E. N., Jablonski, S. A., Hartman, T. R., Henske, E. P., & Golemis, E. A. (2007). HEF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium. *Cell*, 129(7), 1351-1363.
- Rafael, M. S., Cavaco, S., Viegas, C. S., Santos, S., Ramos, A., Willems, B. A., Herfs, M., Theuwissen, E., Vermeer, C., & Simes, D. C. (2014). Insights into the association of G la-rich protein and osteoarthritis, novel splice variants and γ-carboxylation status. *Molecular nutrition & food research*, 58(8), 1636-1646.

- Rauci, A., Laplantine, E., Mansukhani, A., & Basilico, C. (2004). Activation of the ERK1/2 and p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathways Mediates Fibroblast Growth Factor-induced Growth Arrest of Chondrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(3), 1747-1756.
- Reggiori, F., Tucker, K. A., Stromhaug, P. E., & Klionsky, D. J. (2004). The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure. *Developmental cell*, 6(1), 79-90.
- Reinhold, M. I., Abe, M., Kapadia, R. M., Liao, Z., & Naski, M. C. (2004). FGF18 represses noggin expression and is induced by calcineurin. *Journal of biological chemistry*, 279(37), 38209-38219.
- Reiter, J. F., Blacque, O. E., & Leroux, M. R. (2012). The base of the cilium: roles for transition fibres and the transition zone in ciliary formation, maintenance and compartmentalization. *EMBO reports*, 13(7), 608-618.
- Reiter, J. F., & Leroux, M. R. (2017). Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. *Nature reviews Molecular cell biology*, 18(9), 533-547.
- Reker, D., Siebuhr, A., Thudium, C., Gantzel, T., Ladell, C., Michaelis, M., Aspberg, A., Berchtold, M., Karsdal, M., & Gigout, A. (2020). Sprifermin (rhFGF18) versus vehicle induces a biphasic process of extracellular matrix remodeling in human knee OA articular cartilage ex vivo. *Scientific reports*, 10(1), 1-9.
- Ren, L., Peng, C., Hu, X., Han, Y., & Huang, H. (2020). Microbial production of vitamin K2: current status and future prospects. *Biotechnology Advances*, 39, 107453.
- Rice, D. P. (2008). Developmental anatomy of craniofacial sutures. *Craniofacial sutures*, 12, 1-21.
- Rich, D., & Clark, A. (2012). Chondrocyte primary cilia shorten in response to osmotic challenge and are sites for endocytosis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 20(8), 923-930.
- Robbins, D. J., Fei, D. L., & Riobo, N. A. (2012). The Hedgehog signal transduction network. *Science signaling*, 5(246), re6-re6.
- Rohatgi, R., Milenkovic, L., & Scott, M. P. (2007). Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science*, 317(5836), 372-376.
- Rosenbaum, J. L., & Witman, G. B. (2002). Intraflagellar transport. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(11), 813-825.
- Rousseau, F., Bonaventure, J., Legeai-Mallet, L., Pelet, A., Rozet, J.-M., Maroteaux, P., Merrer, M. L., & Munnich, A. (1994). Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature*, 371(6494), 252-254.
- Ruhlen, R., & Marberry, K. (2014). The chondrocyte primary cilium. *Osteoarthritis and cartilage*, 22(8), 1071-1076.
- Ruiz-Perez, V. L., & Goodship, J. A. (2009). *Ellis-van Creveld syndrome and Weyers acroental dysostosis are caused by cilia-mediated diminished response to hedgehog ligands*. 151, 341-351.
- Ruiz-Perez, V. L., Ide, S. E., Strom, T. M., Lorenz, B., Wilson, D., Woods, K., King, L., Francomano, C., Freisinger, P., & Spranger, S. (2000). Mutations in a new gene in Ellis-van Creveld syndrome and Weyers acroental dysostosis. *Nature genetics*, 24(3), 283-286.
- Sahni, M., Raz, R., Coffin, J. D., Levy, D., & Basilico, C. (2001). *STAT1 mediates the increased apoptosis and reduced chondrocyte proliferation in mice overexpressing FGF2*. *Development (Cambridge, England)*, 128(11), 2119-2129.
- Sánchez, I., & Dynlacht, B. D. (2016). Cilium assembly and disassembly. *Nature Cell Biology*, 18(7), 711-717.
- Sanchez, S., Tafforeau, P., & Ahlberg, P. E. (2014). The humerus of Eusthenopteron: a puzzling organization presaging the establishment of tetrapod limb bone marrow. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1782), 20140299.
- Sanchez, S., Tafforeau, P., Clack, J. A., & Ahlberg, P. E. (2016). Life history of the stem tetrapod *Acanthostega* revealed by synchrotron microtomography. *Nature*, 537(7620), 408-411.
- Santos, N., & Reiter, J. F. (2008). Building it up and taking it down: the regulation of vertebrate ciliogenesis. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 237(8), 1972-1981.
- Sarabipour, S., & Hristova, K. (2016). Mechanism of FGF receptor dimerization and activation. *Nature Communications*, 7(1), 10262.
- Satir, P. (2017). CILIA: before and after. *Cilia*, 6(1), 1-11.
- Sato, T., Ohtani, Y., Yamada, Y., Saitoh, S., & Harada, H. (2002). Difference in the metabolism of vitamin K between liver and bone in vitamin K-deficient rats. *British journal of nutrition*, 87(4), 307-314.
- Sawai, H., Oka, K., Ushioda, M., Nishimura, G., Omori, T., Numabe, H., & Kosugi, S. (2019). National survey of prevalence and prognosis of thanatophoric dysplasia in Japan. *Pediatrics International*, 61(8), 748-753.
- Schipani, E., Ryan, H. E., Didrickson, S., Kobayashi, T., Knight, M., & Johnson, R. S. (2001). *Hypoxia in cartilage: HIF-1  $\alpha$  is essential for chondrocyte growth arrest and survival*. *Genes & development*, 15(21), 2865-2876.
- Schmidts, M., Vodopituz, J., Christou-Savina, S., Cortés, C. R., McInerney-Leo, A. M., Emes, R. D., Arts, H. H., Tüysüz, B., D'Silva, J., & Leo, P. J. (2013). Mutations in the gene encoding IFT dynein complex component WDR34 cause Jeune asphyxiating thoracic dystrophy. *The American Journal of Human Genetics*, 93(5), 932-944.
- Schurgers, L. J., Cranenburg, E. C. M., & Vermeer, C. (2017). Matrix Gla-protein: The calcification inhibitor in need of vitamin K. *Thromb Haemost*, 100(10), 593-603.

- Selvamurugan, N., Kwok, S., & Partridge, N. C. (2004). Smad3 Interacts with JunB and Cbfa1/Runx2 for Transforming Growth Factor- $\beta$ 1-stimulated Collagenase-3 Expression in Human Breast Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(26), 27764-27773.
- Sergerie, K., Parent, S., Beauchemin, P., Londono, I., Moldovan, F., & Villemure, I. (2011). Growth plate explants respond differently to in vitro static and dynamic loadings. *Journal of Orthopaedic Research*, 29(4), 473-480.
- Serra, R. (2008). Role of Intraflagellar Transport and Primary Cilia in Skeletal Development. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 291(9), 1049-1061.
- Settembre, C., Arteaga-Solis, E., McKee, M. D., de Pablo, R., Al Awqati, Q., Ballabio, A., & Karsenty, G. (2008). Proteoglycan desulfation determines the efficiency of chondrocyte autophagy and the extent of FGF signaling during endochondral ossification. *Genes & Development*, 22(19), 2645-2650.
- Shan, C., Ghosh, A., Guo, X., Wang, S., Hou, Y., Li, S., & Liu, J. (2019). Roles for osteocalcin in brain signalling: implications in cognition- and motor-related disorders. *Molecular Brain*, 12(1).
- Shapiro, I. M., Layfield, R., Lotz, M., Settembre, C., & Whitehouse, C. (2014). Boning up on autophagy: The role of autophagy in skeletal biology. *Autophagy*, 10(1), 7-19.
- Shao, J.-S., Cai, J., & Towler, D. A. (2006). Molecular Mechanisms of Vascular Calcification. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(7), 1423-1430.
- Shabanian R., Amiri A., Elmi S., & Sheykhan T. (2022). Tracheobronchial Tree Ossification in a 5-Year-Old Boy with Keutel Syndrome: A Case Report. *The Journal of Tehran University Heart Center*, 17(3).
- Shazeeb, M. S., Cox, M. K., Gupta, A., Tang, W., Singh, K., Pryce, C. T., Fogle, R., Mu, Y., Weber, W. D., Bangari, D. S., Ying, X., & Sabbagh, Y. (s. d.). *and MRI Volumetric Imaging*. 14.
- Shea, M. K., Kritchevsky, S. B., Hsu, F.-C., Nevitt, M., Booth, S. L., Kwok, C. K., McAlindon, T. E., Vermeer, C., Drummen, N., & Harris, T. B. (2015). The association between vitamin K status and knee osteoarthritis features in older adults: the Health, Aging and Body Composition Study. *Osteoarthritis and cartilage*, 23(3), 370-378.
- Shearer, M. J., & Kohlmeier, M. (1996). *Chemistry, Nutritional Sources, Tissue Distribution and MBOentaebolHliesamlth1of Vitamin K with Special Reference to*. 6. *The Journal of nutrition*, 126(4 Suppl), 1181S-6S.
- Sheeba, C. J., Andrade, R. P., Duprez, D., & Palmeirim, I. (2010). Comprehensive analysis of fibroblast growth factor receptor expression patterns during chick forelimb development. *The International Journal of Developmental Biology*, 54(10), 1515-1524.
- Shen, W., Searce, L. M., Brestelli, J. E., Sund, N. J., & Kaestner, K. H. (2001). Foxa3 (Hepatocyte Nuclear Factor 3 $\gamma$ ) Is Required for the Regulation of Hepatic GLUT2 Expression and the Maintenance of Glucose Homeostasis during a Prolonged Fast. *Journal of Biological Chemistry*, 276(46), 42812-42817.
- Shepherd, C., Reese, A. E., Reynard, L. N., & Loughlin, J. (2019). Expression analysis of the osteoarthritis genetic susceptibility mapping to the matrix Gla protein gene MGP. *Arthritis research & therapy*, 21(1), 1-9.
- Shi, Y., Chen, W., & Yan, S. (2016). Study on effect of GGX in knee osteoarthritis pathogenesis. *Int J Clin Exp Med*, 9(7), 13657-13663.
- Shiang, R., Thompson, L. M., Zhu, Y.-Z., Church, D. M., Fielder, T. J., Bocian, M., Winokur, S. T., & Wasmuth, J. J. (1994). Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell*, 78(2), 335-342.
- Shimoaka, T., Ogasawara, T., Yonamine, A., Chikazu, D., Kawano, H., Nakamura, K., Itoh, N., & Kawaguchi, H. (2002). Regulation of Osteoblast, Chondrocyte, and Osteoclast Functions by Fibroblast Growth Factor (FGF)-18 in Comparison with FGF-2 and FGF-10 \*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(9), 7493-7500.
- Shintani, T., Mizushima, N., Ogawa, Y., Matsuura, A., Noda, T., & Ohsumi, Y. (1999). Apg10p, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast. *The EMBO journal*, 18(19), 5234-5241.
- Shioi, A. (2002). Vascular Calcification. In H. Morii, Y. Nishizawa, & S. G. Massry (Éds.), *Calcium in Internal Medicine* (p. 479-494). Springer London.
- Shu, B., Zhang, M., Xie, R., Wang, M., Jin, H., Hou, W., Tang, D., Harris, S. E., Mishina, Y., O'Keefe, R. J., Hilton, M. J., Wang, Y., & Chen, D. (2011). BMP2, but not BMP4, is crucial for chondrocyte proliferation and maturation during endochondral bone development. *Journal of Cell Science*, 124(20), 3428-3440.
- Shum, W., Zhang, B. L., Cao, A. S., Zhou, X., Shi, S. M., Zhang, Z. Y., Gu, L. Y., & Shi, S. (2022). Calcium Homeostasis in the Epididymal Microenvironment: Is Extracellular Calcium a Cofactor for Matrix Gla Protein-Dependent Scavenging Regulated by Vitamins. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 827940.
- Shung, C.-Y., Ota, S., Zhou, Z.-Q., Keene, D. R., & Hurlin, P. J. (2012). Disruption of a Sox9- $\beta$ -catenin circuit by mutant Fgfr3 in thanatophoric dysplasia type II. *Human molecular genetics*, 21(21), 4628-4644.
- Silaghi, C. N., Crăciun, A. M., & Cristea, V. (2011). Matrix Gla protein: the inhibitor of vascular and osteoarticular calcifications. *Human & Veterinary Medicine International Journal of the Bioflux Society*. 3(3), 14.

- Silaghi, C. N., Fodor, D., Cristea, V., & Crăciun, A. M. (2012). Synovial and serum levels of uncarboxylated matrix Gla-protein (ucMGP) in patients with arthritis. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, *50*(1), 125-128.
- Silva, A. P., Viegas, C. S. B., Mendes, F., Macedo, A., Guilherme, P., Tavares, N., Dias, C., Rato, F., Santos, N., Faisca, M., Almeida, E. D., Neves, P. L., & Simes, D. C. (2020). Gla-Rich Protein (GRP) as an Early and Novel Marker of Vascular Calcification and Kidney Dysfunction in Diabetic Patients with CKD: A Pilot Cross-Sectional Study. *Journal of Clinical Medicine*, *9*(3).
- Silveira, M. G. M., Castellano, M. V. C. de O., Fuzi, C. E., Coletta, E. N. A. M., & Spinosa, G. N. (2017). Tracheobronchopathia osteochondroplastica. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, *43*, 151-153.
- Simes, D. C., Viegas, C. S. B., Araújo, N., & Marreiros, C. (2020). Vitamin K as a Diet Supplement with Impact in Human Health: Current Evidence in Age-Related Diseases. *Nutrients*, *12*(1).
- Sivaraj, K. K., & Adams, R. H. (2016). Blood vessel formation and function in bone. *Development*, *143*(15), 2706-2715.
- Smits, P., Li, P., Mandel, J., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R., & de Crombrughe, B. (s. d.). The Transcription Factors L-Sox5 and Sox6 Are Essential for Cartilage Formation. *Developmental Cell*, *14*.
- Song, B., Haycraft, C. J., Seo, H., Yoder, B. K., & Serra, R. (2007). Development of the post-natal growth plate requires intraflagellar transport proteins. *Developmental biology*, *305*(1), 202-216.
- Sophia Fox, A. J., Bedi, A., & Rodeo, S. A. (2009). The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports health*, *1*(6), 461-468.
- Sorokin, S. (1962). Centrioles and the formation of rudimentary cilia by fibroblasts and smooth muscle cells. *The Journal of cell biology*, *15*(2), 363-377.
- Spasic, M., & Jacobs, C. R. (2017). *Primary cilia: cell and molecular mechanosensors directing whole tissue function. Seminars in cell & developmental biology*, *71*, 42-52.
- Spater, D., Hill, T. P., Gruber, M., & Hartmann, C. (2006). Role of canonical Wnt-signalling in joint formation. *Eur Cell Mater*, *12*, 71-80.
- Speer, M. Y., Yang, H.-Y., Brabb, T., Leaf, E., Look, A., Lin, W.-L., Frutkin, A., Dichek, D., & Giachelli, C. M. (2009). Smooth Muscle Cells Give Rise to Osteochondrogenic Precursors and Chondrocytes in Calcifying Arteries. *Circulation Research*, *104*(6), 733-741.
- Srinivas, V., Bohensky, J., & Shapiro, I. M. (2009). Autophagy: a new phase in the maturation of growth plate chondrocytes is regulated by HIF, mTOR and AMP kinase. *Cells Tissues Organs*, *189*(1-4), 88-92.
- Stadler, H. S., Higgins, K. M., & Capecchi, M. R. (2001). *Loss of Eph-receptor expression correlates with loss of cell adhesion and chondrogenic capacity in Hoxa13 mutant limbs*.
- Stanley, T. B., Jin, D.-Y., Lin, P.-J., & Stafford, D. W. (1999). The Propeptides of the Vitamin K-dependent Proteins Possess Different Affinities for the Vitamin K-dependent Carboxylase. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(24), 16940-16944.
- Stheneur, C., Dumontier, M.-F., Guedes, C., Fulchignoni-Lataud, M.-C., Tahiri, K., Karsenty, G., & Corvol, M. (2003). Basic fibroblast growth factor as a selective inducer of matrix Gla protein gene expression in proliferative chondrocytes. *The Biochemical journal*, *369*, 63-70.
- St-Jacques, B., Hammerschmidt, M., & McMahon, A. P. (1999). Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes & development*, *13*(16), 2072-2086.
- Stock, M., & Schett, G. (2021). Vitamin K-Dependent Proteins in Skeletal Development and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(17), 9328.
- Su, N., Jin, M., & Chen, L. (2014). Role of FGF/FGFR signaling in skeletal development and homeostasis: learning from mouse models. *Bone research*, *2*(1), 1-24.
- Su, W.-C. S., Kitagawa, M., Xue, N., Xie, B., Garofalo, S., Cho, J., Deng, C., Horton, W. A., & Fu, X.-Y. (1997). Activation of Stat1 by mutant fibroblast growth-factor receptor in thanatophoric dysplasia type II dwarfism. *Nature*, *386*(6622), 288-292.
- Sundaramurthy, S., & Mao, J. J. (2006). Modulation of endochondral development of the distal femoral condyle by mechanical loading. *Journal of orthopaedic research*, *24*(2), 229-241.
- Surmann-Schmitt, C., Dietz, U., Kireva, T., Adam, N., Park, J., Tagariello, A., Önnarfjord, P., Heinegård, D., Schlötzer-Schrehardt, U., Deutzmann, R., von der Mark, K., & Stock, M. (2008). Ucnl, a Novel Secreted Cartilage-specific Protein with Implications in Osteogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(11), 7082-7093.
- Suttamanatwong, S., Jensen, E. D., Schilling, J., Franceschi, R. T., Carlson, A. E., Mansky, K. C., & Gopalakrishnan, R. (2009). Sp proteins and Runx2 mediate regulation of matrix gla protein (MGP) expression by parathyroid hormone. *Journal of Cellular Biochemistry*, *107*(2), 284-292.

- Tabler, J. M., Rigney, M. M., Berman, G. J., Gopalakrishnan, S., Heude, E., Al-lami, H. A., Yannakoudakis, B. Z., Fitch, R. D., Carter, C., Vokes, S., Liu, K. J., Tajbakhsh, S., Egnor, S. R., & Wallingford, J. B. (2017). Cilia-mediated Hedgehog signaling controls form and function in the mammalian larynx. *ELife*, *6*, e19153.
- Tajima, K., Yamakawa, M., Katagiri, T., & Sasaki, H. (1997). Immunohistochemical detection of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor beta-1 in tracheopathia osteochondroplastica. *Virchows Archiv*, *431*(5), 359-363.
- Takahashi, Y., Coppola, D., Matsushita, N., Cualing, H. D., Sun, M., Sato, Y., Liang, C., Jung, J. U., Cheng, J. Q., & Mul, J. J. (2007). Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nature cell biology*, *9*(10), 1142-1151.
- Takahashi, Y., Meyerkord, C. L., & Wang, H.-G. (2009). Bif-1/endophilin B1: a candidate for crescent driving force in autophagy. *Cell Death & Differentiation*, *16*(7), 947-955.
- Takahata, Y., Hagino, H., Kimura, A., Urushizaki, M., Kobayashi, S., Wakamori, K., Fujiwara, C., Nakamura, E., Yu, K., & Kiyonari, H. (2021). Smoc1 and Smoc2 regulate bone formation as downstream molecules of Runx2. *Communications Biology*, *4*(1), 1-11.
- Tamamura, Y., Otani, T., Kanatani, N., Koyama, E., Kitagaki, J., Komori, T., Yamada, Y., Costantini, F., Wakisaka, S., & Pacifici, M. (2005). Developmental regulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signals is required for growth plate assembly, cartilage integrity, and endochondral ossification. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(19), 19185-19195.
- Tang, C.-Y., Wu, M., Zhao, D., Edwards, D., McVicar, A., Luo, Y., Zhu, G., Wang, Y., Zhou, H.-D., Chen, W., & Li, Y.-P. (2021). Runx1 is a central regulator of osteogenesis for bone homeostasis by orchestrating BMP and WNT signaling pathways. *PLOS Genetics*, *17*(1), e1009233.
- Tang, W., Yang, F., Li, Y., de Crombrughe, B., Jiao, H., Xiao, G., & Zhang, C. (2012). Transcriptional regulation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) by osteoblast-specific transcription factor Osterix (Osx) in osteoblasts. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(3), 1671-1678.
- Tang, Z., Lin, M. G., Stowe, T. R., Chen, S., Zhu, M., Stearns, T., Franco, B., & Zhong, Q. (2013). Autophagy promotes primary ciliogenesis by removing OFD1 from centriolar satellites. *Nature*, *502*(7470), 254-257.
- Tao, F., Jiang, T., Tao, H., Cao, H., & Xiang, W. (2020). Primary cilia: Versatile regulator in cartilage development. *Cell Proliferation*, *53*(3), e12765.
- Tavella, S., Biticchi, R., Schito, A., Minina, E., Di Martino, D., Pagano, A., Vortkamp, A., Horton, W. A., Cancedda, R., & Garofalo, S. (2004). Targeted expression of SHH affects chondrocyte differentiation, growth plate organization, and Sox9 expression. *Journal of bone and mineral research*, *19*(10), 1678-1688.
- Tavormina, P. L., Bellus, G. A., Webster, M. K., Bamshad, M. J., Fraley, A. E., McIntosh, I., Szabo, J., Jiang, W., Jabs, E. W., & Wilcox, W. R. (1999). A novel skeletal dysplasia with developmental delay and acanthosis nigricans is caused by a Lys650Met mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene. *The American Journal of Human Genetics*, *64*(3), 722-731.
- Teebi, A. S., Lambert, D. M., Kaye, G. M., Al-Fifi, S., Tewfik, T. L., & Azouz, E. M. (1998). Keutel syndrome: Further characterization and review. *American Journal of Medical Genetics*, *78*(2), 182-187.
- Terkhorn, S., Bohensky, J., Shapiro, I., Koyama, E., & Srinivas, V. (2007). Expression of HIF prolyl hydroxylase isozymes in growth plate chondrocytes: relationship between maturation and apoptotic sensitivity. *Journal of cellular physiology*, *210*(1), 257-265.
- Tiago, D. M., Conceição, N., Caiado, H., Laizé, V., & Cancela, M. L. (2016). Matrix Gla protein repression by miR-155 promotes oncogenic signals in breast cancer MCF-7 cells. *FEBS Letters*, *590*(8), 1234-1241.
- Tohno, S., Takano, Y., Tohno, Y., Moriwake, Y., Minami, T., Utsumi, M., Yamada, M., & Yuri, K. (2000). Age-dependent changes of elements in human trachea. *Biological Trace Element Research*, *77*(2), 131-138.
- Tomarev, S. I., Wistow, G., Raymond, V., Dubois, S., & Malyukova, I. (2003). Gene Expression Profile of the Human Trabecular Meshwork. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *44*(13), 3166-3166.
- Topol, L., Chen, W., Song, H., Day, T. F., & Yang, Y. (2009). Sox9 inhibits Wnt signaling by promoting  $\beta$ -catenin phosphorylation in the nucleus. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(5), 3323-3333.
- Tucker, R. W., Pardee, A. B., & Fujiwara, K. (1979). Centriole ciliation is related to quiescence and DNA synthesis in 3T3 cells. *Cell*, *17*(3), 527-535.
- Tufan, A. C., Satiroglu-Tufan, N. L., Jackson, G. C., Semerci, C. N., Solak, S., & Yagci, B. (2007). Serum or plasma cartilage oligomeric matrix protein concentration as a diagnostic marker in pseudoachondroplasia: differential diagnosis of a family. *European journal of human genetics*, *15*(10), 1023-1028.
- Tukachinsky, H., Lopez, L. V., & Salic, A. (2010). A mechanism for vertebrate Hedgehog signaling: recruitment to cilia and dissociation of SuFu-Gli protein complexes. *Journal of Cell Biology*, *191*(2), 415-428.
- Tuo, Y.-L., & Ye, Y.-F. (2017). MGP is downregulated due to promoter methylation in chemoresistant ER+ breast cancer and high MGP expression predicts better survival outcomes. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, *21*(17), 3871-3878. PubMed.

- Ueno, T., & Komatsu, M. (2017). Autophagy in the liver: functions in health and disease. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, *14*(3), 170-184.
- Ueta, C., Iwamoto, M., Kanatani, N., Yoshida, C., Liu, Y., Enomoto-Iwamoto, M., Ohmori, T., Enomoto, H., Nakata, K., Takada, K., Kurisu, K., & Komori, T. (2001). Skeletal Malformations Caused by Overexpression of Cbfa1 or Its Dominant Negative Form in Chondrocytes. *Journal of Cell Biology*, *153*(1), 87-100.
- Ulbricht, A., Eppler, F. J., Tapia, V. E., van der Ven, P. F., Hampe, N., Hersch, N., Vakeel, P., Stadel, D., Haas, A., & Saftig, P. (2013). Cellular mechanotransduction relies on tension-induced and chaperone-assisted autophagy. *Current Biology*, *23*(5), 430-435.
- Valverde-Franco, G., Liu, H., Davidson, D., Chai, S., Valderrama-Carvajal, H., Goltzman, D., Ornitz, D. M., & Henderson, J. E. (2004). Defective bone mineralization and osteopenia in young adult FGFR3<sup>-/-</sup> mice. *Human Molecular Genetics*, *13*(3), 271-284.
- Vega, R. B., Matsuda, K., Oh, J., Barbosa, A. C., Yang, X., Meadows, E., McAnally, J., Pomajzl, C., Shelton, J. M., Richardson, J. A., Karsenty, G., & Olson, E. N. (2004). Histone Deacetylase 4 Controls Chondrocyte Hypertrophy during Skeletogenesis. *Cell*, *119*(4), 555-566.
- Venkatesh, D. (2017). Primary cilia. *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP*, *21*(1), 8.
- Vermeer, C. (1990).  $\gamma$ -carboxyglutamate-containing proteins and the vitamin K-dependent carboxylase. *Biochemical Journal*, *266*(3), 625-636.
- Venardos, N., Bennett, D., Weyant, M. J., Reece, T. B., Meng, X., & Fullerton, D. A. (2015). Matrix Gla protein regulates calcification of the aortic valve. *Journal of Surgical Research*, *199*(1), 1-6.
- Viegas, C. S. B., Costa, R. M., Santos, L., Videira, P. A., Silva, Z., Araújo, N., Macedo, A. L., Matos, A. P., Vermeer, C., & Simes, D. C. (2017). Gla-rich protein function as an anti-inflammatory agent in monocytes/macrophages: Implications for calcification-related chronic inflammatory diseases. *PLOS ONE*, *12*(5)
- Viegas, C. S. B., Rafael, M. S., Enriquez, J. L., Teixeira, A., Vitorino, R., Luís, I. M., Costa, R. M., Santos, S., Cavaco, S., Neves, J., Macedo, A. L., Willems, B. A. G., Vermeer, C., & Simes, D. C. (2015). Gla-Rich Protein Acts as a Calcification Inhibitor in the Human Cardiovascular System. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *35*(2), 399-408.
- Viegas, C. S. B., Simes, D. C., Laizé, V., Williamson, M. K., Price, P. A., & Cancela, M. L. (2008). Gla-rich Protein (GRP), A New Vitamin K-dependent Protein Identified from Sturgeon Cartilage and Highly Conserved in Vertebrates. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(52), 36655-36664.
- Vina, E. R., & Kwok, C. K. (2018). Epidemiology of osteoarthritis: literature update. *Current opinion in rheumatology*, *30*(2), 160.
- Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G. V., Kronenberg, H. M., & Tabin, C. J. (1996a). Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science*, *273*(5275).
- Vos, T., Lim, S. S., Abbafati, C., Abbas, K. M., Abbasi, M., Abbasifard, M., Abbasi-Kangevari, M., Abbastabar, H., Abd-Allah, F., & Abdelalim, A. (2020). Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, *396*(10258), 1204-1222.
- Vuppalapati, K. K., Boudelique, T., Newton, P. T., Kaminsky, V. O., Wehtje, H., Ohlsson, C., Zhivotovsky, B., & Chagin, A. S. (2015a). Targeted deletion of autophagy genes Atg5 or Atg7 in the chondrocytes promotes caspase-dependent cell death and leads to mild growth retardation. *Journal of Bone and Mineral Research*, *30*(12), 2249-2261.
- Wajih, N., Borrás, T., Xue, W., Hutson, S. M., & Wallin, R. (2004). Processing and Transport of Matrix  $\gamma$ -Carboxyglutamic Acid Protein and Bone Morphogenetic Protein-2 in Cultured Human Vascular Smooth Muscle Cells: EVIDENCE FOR AN UPTAKE MECHANISM FOR SERUM FETUIN. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(41), 43052-43060.
- Wallin, R., Cain, D., & Sane, D. C. (2017). Matrix Gla Protein Synthesis and Gamma-carboxylation in the Aortic Vessel Wall and Proliferating Vascular Smooth Muscle Cells. *Thromb Haemost*, *82*(12), 1764-1767.
- Wallin, R., Schurgers, L. J., & Loeser, R. F. (2010a). Biosynthesis of the vitamin K-dependent matrix Gla protein (MGP) in chondrocytes: a fetuin–MGP protein complex is assembled in vesicles shed from normal but not from osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*, *18*(8), 1096-1103.
- Walsh, D. A. (2007). Pathophysiological mechanisms of angiogenesis. *Advances in clinical chemistry*, *44*, 187-221.
- Wang, F., Rummukainen, P., Pehkonen, M., Säämänen, A.-M., Heino, T. J., & Kiviranta, R. (2022). Mesenchymal cell-derived Wnt1 signaling regulates subchondral bone remodeling but has no effects on the development of growth plate or articular cartilage in mice. *Bone*, *163*, 116497.
- Wang, L., & Dynlacht, B. D. (2018). The regulation of cilium assembly and disassembly in development and disease. *Development*, *145*(18).
- Wang, L., Shao, Y. Y., & Ballock, R. T. (2010). Thyroid hormone-mediated growth and differentiation of growth plate chondrocytes involves IGF-1 modulation of  $\beta$ -catenin signaling. *Journal of Bone and Mineral Research*, *25*(5), 1138-1146.

- Wang, S., Livingston, M. J., Su, Y., & Dong, Z. (2015). Reciprocal regulation of cilia and autophagy via the MTOR and proteasome pathways. *Autophagy*, *11*(4), 607-616.
- Wang, W., Jack, B. M., Wang, H. H., Kavanaugh, M. A., Maser, R. L., & Tran, P. V. (2021). Intraflagellar Transport Proteins as Regulators of Primary Cilia Length. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 661350.
- Wang, X., Manner, P. A., Horner, A., Shum, L., Tuan, R. S., & Nuckolls, G. H. (2004). Regulation of MMP-13 expression by RUNX2 and FGF2 in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis and cartilage*, *12*(12), 963-973.
- Wang, X., Qi, H., Wang, Q., Zhu, Y., Wang, X., Jin, M., Tan, Q., Huang, Q., Xu, W., & Li, X. (2015). FGFR3/fibroblast growth factor receptor 3 inhibits autophagy through decreasing the ATG12-ATG5 conjugate, leading to the delay of cartilage development in achondroplasia. *Autophagy*, *11*(11), 1998-2013.
- Wann, A., & Knight, M. (2012). Primary cilia elongation in response to interleukin-1 mediates the inflammatory response. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *69*(17), 2967-2977.
- Ward, N., & DeNicola, G. (2022). Long-sought mediator of vitamin K recycling discovered. *Nature*, *608*.
- Weaver, K. N., El Hallek, M., Hopkin, R. J., Sund, K. L., Henrickson, M., del Gaudio, D., Yuksel, A., Acar, G. O., Bober, M. B., Kim, J., & Boyadjiev, S. A. (2014). Keutel syndrome: Report of two novel MGP mutations and discussion of clinical overlap with arylsulfatase E deficiency and relapsing polychondritis. *American Journal of Medical Genetics Part A*, *164*(4), 1062-1068.
- Webber, J. L., & Tooze, S. A. (2010). Coordinated regulation of autophagy by p38 $\alpha$  MAPK through mAtg9 and p38IP. *The EMBO journal*, *29*(1), 27-40.
- Wei, F.-F., Huang, Q.-F., Zhang, Z.-Y., Van Keer, K., Thijs, L., Trensou, S., Yang, W.-Y., Cauwenberghs, N., Mujaj, B., & Kuznetsova, T. (2018). Inactive matrix Gla protein is a novel circulating biomarker predicting retinal arteriolar narrowing in humans. *Scientific Reports*, *8*(1), 1-8.
- Wei, J., & Karsenty, G. (2015). An overview of the metabolic functions of osteocalcin. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, *16*(2), 93-98
- Weidberg, H., Shvets, E., & Elazar, Z. (2011). Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes. *Annual review of biochemistry*, *80*, 125-156.
- Weinstein, M., Xu, X., Ohyama, K., & Deng, C. X. (1998). FGFR-3 and FGFR-4 function cooperatively to direct alveogenesis in the murine lung. *Development*, *125*(18), 3615-3623.
- Wheway, G., Nazlamova, L., & Hancock, J. T. (2018). Signaling through the primary cilium. *Frontiers in cell and developmental biology*, *6*, 8.
- Whitty, C., Pernstich, C., Marris, C., McCaskie, A., Jones, M., & Henson, F. (2022). Sustained delivery of the bone morphogenetic proteins BMP-2 and BMP-7 for cartilage repair and regeneration in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage Open*, *4*(1), 100240.
- Wiedemann, M., & Trueb, B. (2000). Characterization of a novel protein (FGFRL1) from human cartilage related to FGF receptors. *Genomics*, *69*(2), 275-279.
- Wilhelmi, G., & Faust, R. (1976). Suitability of the C 57 black mouse as an experimental animal for the study of skeletal changes due to ageing, with special reference to osteo-arthritis and its response to tribenoside. *Pharmacology*, *14*(4), 289-296.
- Willems, B. A., Furmanik, M., Caron, M. M. J., Chatrou, M. L. L., Kusters, D. H. M., Welting, T. J. M., Stock, M., Rafael, M. S., Viegas, C. S. B., Simes, D. C., Vermeer, C., Reutelingsperger, C. P. M., & Schurgers, L. J. (2018). Ucpa/GRP inhibits phosphate-induced vascular smooth muscle cell calcification via SMAD-dependent BMP signalling. *Scientific Reports*, *8*(1).
- Williantarraa, I., Richardob, T., Kumalasaria, I., & Partha, P. V. (2021). An Overview of the Primary Cilium and RPGRIP1L: The Signalling Hub's Anchor for Organ Development and Homeostasis. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences*, *17*(5), 582-592.
- Wong, M., & Carter, D. (2003). Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: a research perspective. *Bone*, *33*(1), 1-13.
- Wu, M., Cudjoe, O., Shen, J., Chen, Y., & Du, J. (2020). The host autophagy during Toxoplasma infection. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 589604.
- Wu, M., Rementer, C., & Giachelli, C. M. (2013). Vascular Calcification: An Update on Mechanisms and Challenges in Treatment. *Calcified Tissue International*, *93*(4), 365-373.
- Xie, Y., Su, N., Yang, J., Tan, Q., Huang, S., Jin, M., Ni, Z., Zhang, B., Zhang, D., Luo, F., Chen, H., Sun, X., Feng, J. Q., Qi, H., & Chen, L. (2020). FGF/FGFR signaling in health and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *5*(1), 181.
- Xie, Y., Zinkle, A., Chen, L., & Mohammadi, M. (2020). Fibroblast growth factor signalling in osteoarthritis and cartilage repair. *Nature Reviews Rheumatology*, *16*(10), 547-564

- Xing, W., Aghajanian, P., Goodluck, H., Kesavan, C., Cheng, S., Pourteymoor, S., Watt, H., Alarcon, C., & Mohan, S. (2016). Thyroid hormone receptor- $\beta$ 1 signaling is critically involved in regulating secondary ossification via promoting transcription of the *Ihh* gene in the epiphysis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *310*(10), E846-E854.
- Xing, W., Cheng, S., Wergedal, J., & Mohan, S. (2014). Epiphyseal chondrocyte secondary ossification centers require thyroid hormone activation of Indian hedgehog and osterix signaling. *Journal of bone and mineral research*, *29*(10), 2262-2275.
- Xing, W., Govoni, K. E., Donahue, L. R., Kesavan, C., Wergedal, J., Long, C., Bassett, J. D., Gogakos, A., Wojcicka, A., & Williams, G. R. (2012). Genetic evidence that thyroid hormone is indispensable for prepubertal insulin-like growth factor-I expression and bone acquisition in mice. *Journal of bone and mineral research*, *27*(5), 1067-1079.
- Xu, Z., Zhong, K., Guo, G., Xu, C., Song, Z., Wang, D., & Pan, J. (2021). circ\_TGFBR2 Inhibits Vascular Smooth Muscle Cells Phenotypic Switch and Suppresses Aortic Dissection Progression by Sponging miR-29a. *Journal of Inflammation Research, Volume 14*, 5877-5890.
- Yagami, K., Suh, J.-Y., Enomoto-Iwamoto, M., Koyama, E., Abrams, W. R., Shapiro, I. M., Pacifici, M., & Iwamoto, M. (1999). Matrix Gla Protein Is a Developmental Regulator of Chondrocyte Mineralization And, When Constitutively Expressed, Blocks Endochondral and Intramembranous Ossification in the Limb. *Journal of Cell Biology*, *147*(5), 1097-1108.
- Yamashita, S., Andoh, M., Ueno-Kudoh, H., Sato, T., Miyaki, S., & Asahara, H. (2009). Sox9 directly promotes *Bapx1* gene expression to repress *Runx2* in chondrocytes. *Experimental cell research*, *315*(13), 2231-2240.
- Yang, Q., Zhou, Y., Cai, P., Fu, W., Wang, J., Wei, Q., & Li, X. (2019). Up-regulated HIF-2 $\alpha$  contributes to the Osteoarthritis development through mediating the primary cilia loss. *International immunopharmacology*, *75*, 105762.
- Yang, X., Qiao, D., Meyer, K., & Friedl, A. (2009). Signal transducers and activators of transcription mediate fibroblast growth factor-induced vascular endothelial morphogenesis. *Cancer research*, *69*(4), 1668-1677.
- Yang, Y. (2003). Wnts and wing: Wnt signaling in vertebrate limb development and musculoskeletal morphogenesis. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, *69*(4), 305-317.
- Yang, Y., Topol, L., Lee, H., & Wu, J. (2003). *Wnt5a* and *Wnt5b* exhibit distinct activities in coordinating chondrocyte proliferation and differentiation. *Development*, *130*(5), 1003-1015.
- Yang, Z., & Klionsky, D. J. (2009). An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Autophagy in infection and immunity*, 1-32.
- Yang, Z., & Klionsky, D. J. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Current opinion in cell biology*, *22*(2), 124-131.
- Yao, Y., Jumabay, M., Wang, A., & Boström, K. I. (2011). Matrix Gla protein deficiency causes arteriovenous malformations in mice. *The Journal of clinical investigation*, *121*(8), 2993-3004.
- Yao, Y., Bennett, B. J., Wang, X., Rosenfeld, M. E., Giachelli, C., Lusis, A. J., & Boström, K. I. (2010). Inhibition of Bone Morphogenetic Proteins Protects Against Atherosclerosis and Vascular Calcification. *Circulation Research*, *107*(4), 485-494.
- Yao, Y., Jumabay, M., Ly, A., Radparvar, M., Cubberly, M. R., & Boström, K. I. (2013). A Role for the Endothelium in Vascular Calcification. *Circulation Research*, *113*(5), 495-504.
- Yao, Y., Jumabay, M., Wang, A., & Boström, K. I. (2011). Matrix Gla protein deficiency causes arteriovenous malformations in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, *121*(8), 2993-3004.
- Yao, Y., Yao, J., Radparvar, M., Blazquez-Medela, A. M., Guihard, P. J., Jumabay, M., & Boström, K. I. (2013). Reducing Jagged 1 and 2 levels prevents cerebral arteriovenous malformations in matrix Gla protein deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(47), 19071-19076.
- Yao, Y., Zebboudj, A. F., Shao, E., Perez, M., & Boström, K. (2006). Regulation of Bone Morphogenetic Protein-4 by Matrix GLA Protein in Vascular Endothelial Cells Involves Activin-like Kinase Receptor 1. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(45), 33921-33930.
- Yasoda, A., Komatsu, Y., Chusho, H., Miyazawa, T., Ozasa, A., Miura, M., Kurihara, T., Rogi, T., Tanaka, S., & Suda, M. (2004). Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway. *Nature medicine*, *10*(1), 80-86.
- Yilmaz Gulec, E., Ali, B. R., John, A., & Tuysuz, B. (2022). Spondylometaepiphyseal Dysplasia Short Limb-Abnormal Calcification Type in Turkish Patients Reveals a Novel Mutation and New Features. *Molecular Syndromology*, *13*(1), 23-37.
- Ylä-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E., & Eskelinen, E. (2009). Monitoring autophagy by electron microscopy in Mammalian cells. *Methods in enzymology*, *452*, 143-164.

- Yoshida, C. A., Yamamoto, H., Fujita, T., Furuichi, T., Ito, K., Inoue, K., Yamana, K., Zanma, A., Takada, K., Ito, Y., & Komori, T. (2004). Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of *Indian hedgehog*. *Genes & Development*, *18*(8), 952-963.
- Young, A. R., Chan, E. Y., Hu, X. W., Köchl, R., Crawshaw, S. G., High, S., Hailey, D. W., Lippincott-Schwartz, J., & Tooze, S. A. (2006). Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *Journal of cell science*, *119*(18), 3888-3900.
- Yu, K., & Ornitz, D. M. (2008). FGF signaling regulates mesenchymal differentiation and skeletal patterning along the limb bud proximodistal axis. *Development (Cambridge, England)*, *135*(3), 483-491.
- Yu, P. B., Hong, C. C., Sachidanandan, C., Babitt, J. L., Deng, D. Y., Hoyng, S. A., Lin, H. Y., Bloch, K. D., & Peterson, R. T. (2008). Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nature chemical biology*, *4*(1), 33-41.
- Yuan, X., Serra, R. A., & Yang, S. (2015). Function and regulation of primary cilia and intraflagellar transport proteins in the skeleton. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1335*(1), 78-99.
- Yuan, X., & Yang, S. (2015). Cilia/Ift protein and motor-related bone diseases and mouse models. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, *20*, 515.
- Zebboudj, A. F., Imura, M., & Boström, K. (2002). Matrix GLA Protein, a Regulatory Protein for Bone Morphogenetic Protein-2. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(6), 4388-4394.
- Zelzer, E., Glotzer, D. J., Hartmann, C., Thomas, D., Fukai, N., Soker, S., & Olsen, B. R. (2001). Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/Runx2. *Mechanisms of development*, *106*(1-2), 97-106.
- Zeng, L., Kempf, H., Murtaugh, L. C., Sato, M. E., & Lassar, A. B. (2002). Shh establishes an Nkx3. 2/Sox9 autoregulatory loop that is maintained by BMP signals to induce somitic chondrogenesis. *Genes & development*, *16*(15), 1990-2005.
- Zhang, J., Ma, Z., Yan, K., Wang, Y., Yang, Y., & Wu, X. (2019a). Matrix Gla Protein Promotes the Bone Formation by Up-Regulating Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway. *Frontiers in Endocrinology*, *10*.
- Zhang, X., Yang, Y., Li, X., Zhang, H., Gang, Y., & Bai, L. (2019). Alterations of autophagy in knee cartilage by treatment with treadmill exercise in a rat osteoarthritis model. *International Journal of Molecular Medicine*, *43*(1), 336-344.
- Zhang, Y., & Tang, Z.-Y. (2013). Research Progress of Warfarin-associated Vascular Calcification and Its Possible Therapy. *Journal of cardiovascular pharmacology*, *63*.
- Zhang, Y., Vasheghani, F., Li, Y., Blati, M., Simeone, K., Fahmi, H., Lussier, B., Roughley, P., Lagares, D., & Pelletier, J.-P. (2015). Cartilage-specific deletion of mTOR upregulates autophagy and protects mice from osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, *74*(7), 1432-1440.
- Zhang, Y., Zhao, L., Wang, N., Li, J., He, F., Li, X., & Wu, S. (2019b). Unexpected role of matrix Gla protein in osteoclasts: inhibiting osteoclast differentiation and bone resorption. *Molecular and Cellular Biology*, *39*(12), e00012-19.
- Zheng, Q., Zhou, G., Morello, R., Chen, Y., Garcia-Rojas, X., & Lee, B. (2003). Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression in vivo. *The Journal of cell biology*, *162*(5), 833-842.
- Zhong, Y., Wang, Q. J., Li, X., Yan, Y., Backer, J. M., Chait, B. T., Heintz, N., & Yue, Z. (2009). Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nature cell biology*, *11*(4), 468-476.
- Zhou, G., Zheng, Q., Engin, F., Munivez, E., Chen, Y., Sebald, E., Krakow, D., & Lee, B. (2006). Dominance of SOX9 function over RUNX2 during skeletogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(50), 19004-19009.
- Zhou, X., von der Mark, K., Henry, S., Norton, W., Adams, H., & de Crombrughe, B. (2014). Chondrocytes Transdifferentiate into Osteoblasts in Endochondral Bone during Development, Postnatal Growth and Fracture Healing in Mice. *PLoS Genetics*, *10*(12), e1004820.
- Zhou, Z.-Q., Ota, S., Deng, C., Akiyama, H., & Hurlin, P. J. (2015). Mutant activated FGFR3 impairs endochondral bone growth by preventing SOX9 downregulation in differentiating chondrocytes. *Human molecular genetics*, *24*(6), 1764-1773.
- Zimmerman, L. B., De Jesús-Escobar, J. M., & Harland, R. M. (1996). The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell*, *86*(4), 599-606.
- Zoch, M. L., Clemens, T. L., & Riddle, R. C. (2016). New insights into the biology of osteocalcin. *Bone*, *82*, 42-49.
- Zuscik, M. J., Hilton, M. J., Zhang, X., Chen, D., & O'Keefe, R. J. (2008). Regulation of chondrogenesis and chondrocyte differentiation by stress. *Journal of Clinical Investigation*, *118*(2), 429-438.



# Annexes



# A preliminary study exploring the mechanical properties of normal and Mgp-deficient mouse femurs during early growth

Proc IMechE Part H:  
J Engineering in Medicine  
2022, Vol. 236(8) 1106–1117  
© IMechE 2022  
Article reuse guidelines:  
sagepub.com/journals-permissions  
DOI: 10.1177/09544119221109019  
journals.sagepub.com/home/pih  


Cédric Laurent<sup>1</sup> , Alexandre Marano<sup>2</sup>, Adrien Baldit<sup>1</sup> , Maude Ferrari<sup>3</sup>, Jean-Christophe Perrin<sup>3</sup>, Olivier Perroud<sup>1</sup>, Arnaud Bianchi<sup>2</sup> and Hervé Kempf<sup>2</sup>

## Abstract

Matrix Gla protein (MGP) is mostly known to be a calcification inhibitor; as its absence leads to ectopic calcification of different tissues such as cartilage or arteries. MGP deficiency also leads to low bone mass and delayed bone growth. In the present contribution, we investigate the effect of MGP deficiency on the structural and material mechanical bone properties by focusing on the elastic response of femurs undergoing three-points bending. To this aim, biomechanical tests are performed on femurs issued from Mgp-deficient mice at 14, 21, 28, and 35 days of postnatal life and compared to healthy control femurs.  $\mu$ CT acquisitions enable to reconstruct bone geometries and are used to construct subject-specific finite element models avoiding some of the reported limitations concerning the use of beam-like assumptions for small bone samples. Our results indicate that MGP deficiency may be associated to differences in both structural and material properties of femurs during early stages of development. MGP deficiency appears to be related to a decrease in bone dimensions, compensated by higher material properties resulting in similar structural bone properties at P35. The search for a unique density-elasticity relationship based on calibrated bone mineral density (BMD) indicates that MGP deficiency may affect bone tissue in several ways, that may not be represented uniquely from the quantification of BMD. Despite of its limitation to elastic response, the present preliminary study reports for the very first time the mechanical skeletal properties of Mgp-deficient mice at early stages of development.

## Keywords

Bone properties, MGP mutation, bending test, mouse femur, finite element simulation

Date received: 10 December 2021; accepted: 31 May 2022

## Introduction

Matrix Gla Protein (MGP) is known to be a potent inhibitor of calcification mostly secreted by smooth muscle cells and chondrocytes.<sup>1</sup> Indeed, mice lacking MGP, or *Mgp*<sup>-/-</sup> mice, exhibit spontaneous massive vascular calcification that leads to their premature sudden death between 2 and 8 weeks of age due to aortic rupture and subsequent internal hemorrhage.<sup>1–3</sup> Calcification also initiates early in various cartilage structures including trachea, nasal septum, and growth plate. Additionally, in their very short lifespan, *Mgp*<sup>-/-</sup> mice develop a moderate dwarfism leading to shortened appendicular elements and a low bone mass phenotype leading to osteopenia.<sup>1,4</sup> Recent studies have brought some clues to explain the apparent paradox of the latter

phenotype, by pointing out that MGP is not only a strong calcification inhibitor but is also involved in osteoblast formation<sup>4,5</sup> and in the regulation of osteoclast differentiation and function.<sup>6</sup> In other words, MGP participates in both bone formation and bone resorption. Thus, despite excessive calcification observed

<sup>1</sup>CNRS UMR 7239 LEM3, Université de Lorraine, Metz, France

<sup>2</sup>CNRS UMR 7365 IMoPA, Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France

<sup>3</sup>CNRS UMR 7563 LEMTA, Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France

## Corresponding author:

Cédric Laurent, CNRS UMR 7239 LEM3, Université de Lorraine, 2 avenue de la forêt de Haye, F-54, Metz, 54502, France.

Email: cedric.laurent@univ-lorraine.fr

in the growth plate<sup>1,4</sup>,  $Mgp^{-/-}$  mice develop a low bone mass that seems to result from an unbalanced equilibrium of bone resorption over bone formation. The original study describing the  $Mgp^{-/-}$  mice initially reported that those mice are more prone to bone fractures,<sup>1</sup> which could be attributed to lower bone mass. Meanwhile, it has been reported in human calcanei that higher calcification may lead to higher bone strength,<sup>7</sup> which could have led to the opposite hypothesis due to the reported over-calcification of  $Mgp^{-/-}$  mice tissues. There is therefore a lack of understanding concerning the roles of both structural (macroscopic) changes and material (local) changes of bone properties in the apparent modification of the  $Mgp^{-/-}$  mice skeletal properties. While an extensive experimental campaign may be conducted to assess such structural and material changes, MGP-deficient bone samples are particularly difficult to collect since  $Mgp$ -deficient mice show a very short life span. There is therefore a need to get the maximum information from a limited number of samples.

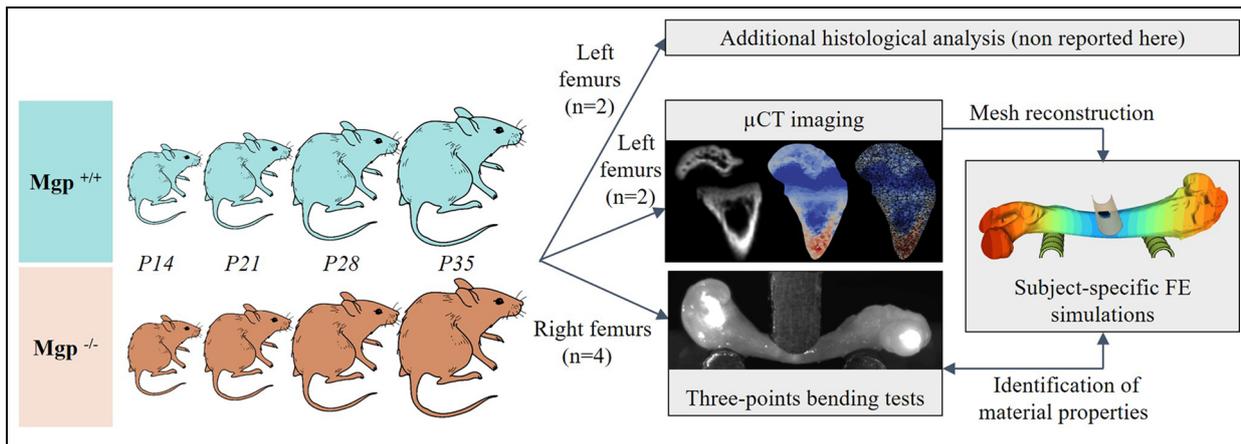
To quantify those specific changes, mechanical testing is a commonly reported technique which enables to characterize the mechanical response of skeletal samples at the structural scale, and allows comparative studies in order to evaluate phenotypic changes. The emergence of such biomechanical studies, generally combined to morphological analyses, have recently motivated the publication of systematic guidelines.<sup>8</sup> Among the common reported techniques, three-points bending tests on long bones have been particularly used in order to investigate rat or mouse skeletal properties,<sup>9–12</sup> since it enables to properly prescribe boundary conditions for small samples.<sup>8</sup> Such mechanical tests enable to compute the overall bending stiffness, but obviously do not give access to a characterization of local tissue properties without making use of a model. Standard equations from beam theory reminded in<sup>8,13</sup> are classically used in order to interpret results from bending tests on long bone,<sup>10,11</sup> giving access to a uniform equivalent Young modulus from a measurement of the second moment of inertia in the direction of bending. However, such an approach is limited by numerous and debatable associated assumptions: (i) the ratio between bending span and bone diameter may limit the validity of Euler-Bernoulli beam theory, since for small bending spans most of the deflection will be due to shear stresses rather than bending<sup>13</sup> (ii) the tested sample is obviously far from being a homogeneous material with a single Young modulus (iii) the geometrical changes along the bone may not be reduced to a single measure of cross-sectional moment of inertia (iv) the bending tests do not result in homogeneous stress field within the sample. Such limitations have been pointed out by comparing the responses of different long bones to three-points bending,<sup>12</sup> which permitted to conclude that such tests may give acceptable mechanical properties only for wide aspect ratio (bone length/width). It has been therefore reported that the

calculated Young modulus may be underestimated by a factor 2–6.<sup>8</sup>

When assessing the structural response of bones to mechanical tests, particularly to assess the effect of MGP deficiency in the current study, the effect of the changes in both geometry and material properties should be evaluated and separated. For instance, it has been reported that the deletion of MGP both affects the tissue composition and the global morphology of bone elements.<sup>4</sup> Consequently, a proper approach enabling to investigate separately the effect of MGP on both structural and material properties of bone is required. In similar studies for different metabolic disorders, it has been reported that geometrical changes may dominate the changes in material properties,<sup>14–16</sup> while other studies have concluded to the exact opposite, emphasizing the crucial role of material changes rather than geometrical changes.<sup>17</sup> Such contradictory conclusions may partly come from the limitations described above concerning the exploitation of three-points bending tests results, and obviously depends on the metabolic change which is investigated in each study.

As an alternative to the beam theory-based approach mentioned previously, numerous studies have pointed out that Computed Tomography (CT) combined with subject-specific Finite Element (FE) models enable to estimate bone stiffness at the structural scale starting from an adapted constitutive law for bone properties.<sup>18</sup> Using an inverse method, this approach may be extended to the identification of bone properties from experimental biomechanical data. Such FE models usually make use of a density-elasticity relationship in order to locally transform the information available in CT on the form of Hounsfield Units (HU) into Young moduli usable in FE models. Density-elasticity relationships on the form of power laws have been widely reported and frequently used in the past decades in human bones.<sup>19–21</sup> However, in other studies, bone density and Young modulus of growing mice have been reported to be poorly correlated.<sup>22</sup> The question of the extension of such subject-specific FE models for growing mice is therefore still open, since the evaluation of elastic properties of murine bones usually involves the strong assumptions reminded above.

The objective of the present contribution is to investigate the structural and material variations in femur mechanical properties in control and MGP-deficient mouse models by combining experimental structural mechanical testing and subject-specific FE simulations. Since MGP-deficient mice do not reach adulthood due to severe pathological calcification of their arteries, we focused on the first stages of growth with consequently a limited number of samples. We hypothesized that the effect of MGP deficiency had a visible effect on the overall bending stiffness of femurs. We further hypothesized that the use of an inverse approach from FE simulations of bending tests may enable to separate the effects of bone geometries and bone material properties



**Figure 1.** Global view of the protocol. Macroscopic results of three-points bending ( $n = 4$ ) tests are combined to subject specific finite element simulations ( $n = 2$ ) in order to get the maximum information from a limited number of samples.

in a more comprehensive way than frequently reported approaches based on a beam-like approximation. In the next sections, the methods for sample preparation as well as for mechanical testing, CT imaging and FE reconstructions will be described. Results will be presented concerning the femur structural properties, and the material properties of femurs issued from control and mutated animals will be compared from the detailed computational approach. According to authors knowledge, this study reports for the first time the mechanical skeletal properties of MGP-deficient mice at early stages of development. Conclusions will be finally drawn regarding the forthcoming steps aiming at comprehensively investigating the effect of MGP deficiency on skeletal properties.

## Material and methods

### Animal model

Mgp-deficient mice generation, performed by insertion of neomycin cassette in C57BL/6 background, was described previously.<sup>1</sup> The deficient ( $Mgp^{-/-}$ ) and control ( $Mgp^{+/+}$ ) mice were littermates obtained by the breeding of heterozygous mice ( $Mgp^{+/-}$ ). All animals were maintained in a pathogen-free standard animal facility, ensuring a constant humidity ( $55\% \pm 10\%$ ) and temperature ( $22^\circ\text{C} \pm 2$ ) in 12h dark-light cycle condition. They were fed *ad libitum* with standard food diet (Scientific Animal food and Engineering, France). Genotype were determined by quantitative PCR on genomic DNA extracted from ear biopsies. The animal study was conducted in accordance with the ARRIVE guidelines and the Directive 2010/63/EU.

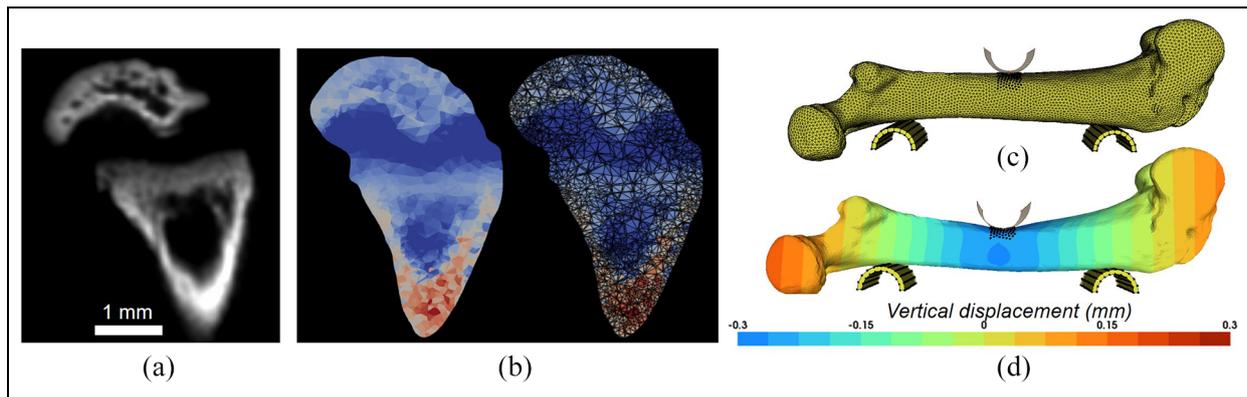
### Sample preparation

After euthanasia, femurs were harvested at 14 ( $n = 4$ ), 21 ( $n = 4$ ), 28 ( $n = 4$ ), and 35 ( $n = 4$ ) days of postnatal life for MGP deficient ( $Mgp^{-/-}$ ) and control ( $Mgp^{+/+}$ ) models (Figure 1). In the following sections, the eight

different groups are referred to as  $P14^{-/-}$ ;  $P14^{+/+}$ ;  $P21^{-/-}$ ;  $P21^{+/+}$ ;  $P28^{-/-}$ ;  $P28^{+/+}$ ;  $P35^{-/-}$ ;  $P35^{+/+}$  depending on the time of harvesting and the mutation of the *Mgp* gene, the letter P standing for *postnatal*. For each femur samples were placed into Dulbecco's Phosphate Buffered Saline solution 1X (DPBS, Sigma life science, D8537) and stored at  $-20^\circ\text{C}$  after manually removing the soft tissues. Based on preliminary data reported in Supplemental Appendix 1, it was assumed in the present study that left and right femurs showed identical mechanical and morphological characteristics. Since both mechanical testing and 3D imaging were likely to affect bone properties, as emphasized by the Supplemental Appendix 2, right femurs were used for three-points bending mechanical testing (section 2.3) while left femurs were used for 3D imaging using micro-CT ( $\mu$ CT, section 2.4). Among the four samples available for each group, only two samples were considered for  $\mu$ CT imaging and finite element simulations since the remaining samples will be used for forthcoming in-depth histological (destructive) analyses (not reported here).

### Mechanical testing

Three-points bending mechanical testing were performed on right femurs ( $n = 4$  per group) using a custom bending stand mounted on a tension-compression device (Zwicki Z0.50 TN with a 100 N load cell), and following the recently reported guidelines.<sup>8</sup> The custom bending stand consisted in two fixed bottom anvils (hereafter called *bending stand*) separated by a span of 5 mm for all samples and offering a radius of 0.5 mm at the contact with the sample to allow rotation. The upper moving anvil (here after called *bending punch*) was mounted onto the Zwick testing machine also presenting a radius of 0.5 mm. Samples were precisely weighted (Sartorius CPA225D scale with a reproducibility of  $\pm 50 \mu\text{g}$ ), and then mounted onto the bending stand so that a bending load was applied in the



**Figure 2.** (a) Example of  $\mu$ CT acquisition of the distal epiphysis (for the group  $PI4^{+/+}$ ), emphasizing the bone microstructure and growth plate, (b) Associated finite element tetrahedral mesh with local assignment of gray level intensity, (c and d) Example of finite element simulation of the bending test: at the beginning (c) and the end (d) of the prescribed displacement, Color code in (d) corresponds to the vertical displacement field (mm).

anteroposterior direction, the bending punch being in contact with the anterior (relatively straight) surface of the femurs. A displacement was prescribed at the speed of 0.01 mm/s until the response was clearly beyond the elastic response, which corresponded to a prescribed displacement of  $\sim 1$  mm for each sample. Prescribed displacement and vertical force were recorded. The bending stiffness (in N/mm) was characterized from the linear regression of the force-displacement curve in the linear region delimited by a prescribed displacement of 0.15 mm (emphasized in yellow in Figure 3). The ultimate load (in N) was defined as the maximum of the force-displacement curve. Post-yield behavior, including observable damage,<sup>9</sup> was recorded but not exploited in the subsequent sections since the present study was focused on the proper identification of whole-bone and tissue-level elastic properties. Videos (available upon request) were recorded using a high-resolution camera (AVT Manta 12Mpx) to precisely monitor the bending test and reproduce boundary conditions within finite element simulations. The data presented hereafter is available on [dorel.univ-lorraine.fr](http://dorel.univ-lorraine.fr) (doi:10.12763/JMN8AS).

### *$\mu$ CT imaging, geometry, and mesh reconstruction*

Left femurs ( $n = 2$  per group) were thawed in saline solution at 20°C for 2 h, mounted in Pyrex thin wall tubes (Cortecnet, France) and finally scanned at 70 kVp–50  $\mu$ A with an isotropic resolution of 30  $\mu$ m (Figure 2(a)) (Easytom Nano, RX-solution, France). An additional tube containing two calibration phantoms for bone mineral density (BMD) was placed in parallel with the set up during each acquisition, since BMD is related to the linear attenuation coefficient issued from  $\mu$ CT.<sup>23</sup> BMD was used as an equivalent measure of the amount of mineralized tissue at the level of a continuum made of bone and non-bone voxels. The concentration in calcium hydroxyapatite (CaHA) of calibrations phantom were 0.25 and 0.75 g/cm<sup>3</sup> according to the manufacturer (Bruker-MicroCT CT-analyzer, Bruker, USA), and used to compute BMD.

Tetgen<sup>24</sup> and PyVista<sup>25</sup> were then used to reconstructed tetrahedral finite element meshes from a threshold-based segmentation of the external geometry of bones (Figure 2(b)), each tetrahedron being linked with the local gray level (expressed in Hounsfield Units, HU) with correction of partial volume artifacts as reported elsewhere.<sup>18</sup> Mesh sizes were issued from a previous (non-reported) convergence analysis, resulting in around 152,000 elements depending on the sample.

Calibration phantoms were also segmented and reconstructed following the same procedure, and the mean HU values of each calibration phantom was computed and linked with their concentration in CaHA so as to determine a relationship between HU values and BMD within the  $\mu$ CT volume. In the case of a uniform Young modulus (see section 2.6 for material properties) only the cortical wall of the generated volume meshes was considered in the simulations. This was performed by extracting the internal elements (i.e. not belonging to the surface) with an assigned BMD higher than 0.1 g/cm<sup>3</sup>, thus excluding the central bone marrow region. The lengths and external volumes of reconstructed geometries were then computed and compared. Cortical volume was defined as the volume of the extracted mesh based on the BMD threshold, enabling to compute the ratio of cortical volume and external volume. Every reconstructed geometry was then rotated to ensure that the mean line of the diaphysis was orthogonal to the prescribed displacement, and that the medial-lateral axis defined from the knee condyles was aligned with the direction of the bending stand. In order to confront the proposed FE approach with frequently reported approaches based on a beam-like approximation, the second moment of inertia was calculated from a FE mesh cross-section at the level of the bending punch. The reconstructed meshes are available on [dorel.univ-lorraine.fr](http://dorel.univ-lorraine.fr) (doi:10.12763/JMN8AS).

### *Subject-specific finite element model*

The bending test was simulated using a non-linear Finite Element (FE) procedure reported previously for

canine bone.<sup>18,26</sup> Briefly, the procedure was fully automated starting from the bone geometry reconstructed as reported in the previous section. FE analyses were carried out in parallel using the implicit solver *Metafor* that has been described elsewhere.<sup>27</sup> Simulations were run using local computing resources, and central processing unit (CPU) time for a global simulation of the 16 samples (Eight groups,  $n = 2$  for each group) was  $\sim 4$  h. The bending stand and the bending punch (Figure 2(c) and (d)) were considered rigid, and placed in such a way that they were initially in slight contact with the bone surface, and a prescribed displacement of 0.5 mm was applied to the bending punch while the bending stand was totally fixed. To preserve global symmetry and prevent axial and lateral rigid body motion, a tie contact was considered between bending punch at the bone surface, while a frictional contact with a friction coefficient arbitrarily fixed at 0.2 was assumed between the bending stand and the bone surface. To compare with experimental results, the simulated bending stiffness was computed from the ratio between reaction force at the level of the bending punch and the prescribed displacement.

### Material properties

The constitutive law considered in the present study was limited to linear elasticity, since the objective of FE modeling was to provide with a proper separation of whole-bone level and tissue-level elastic mechanical properties when exploiting the results of three-points bending. Two cases were thus considered in the present study: in the first case (hereafter called *density-dependent material properties*), a density-elasticity relationship was established from the values of physical bone density, by firstly establishing a linear relation between BMD and physical density. Such a relation has been identified from the physical density of calibration phantoms described above. The density-dependent relationship was formulated by a power law on the form  $E = \alpha\rho^\beta$ , with  $E$  the local Young's Modulus of bone expressed in MPa,  $\rho$  the dimensionless physical density of bone, and  $\alpha$  and  $\beta$  two constants to be identified. A global identification was performed in such a way that the Mean Squared Error (MSE) between FE predictions of bending stiffness and experimental value was minimized, exploring a landscape  $\alpha \in [10, 55]$  with a step of 0.1, and  $\beta \in [10, 20]$  with a step of 0.1. Values of MSE were then interpolated over this two-dimensional space using cubic interpolation in order to head for the parameters minimizing the MSE. In the second case (hereafter called *uniform material properties*), only the cortical bone was considered in the FE simulations, and a single Young's modulus was identified independently for each sample in such a way that the FE prediction of bending stiffness was equal to experimental value. In order to emphasize the difference between this FE-based approach and frequently reported results based on a beam model, the Young's modulus was also

identified using the classical relation reported for a beam subject to three-points bending:

$$E = \frac{KL^3}{48I} \quad (1)$$

with  $E$  the Young's modulus,  $K$  the bending stiffness,  $L$  the span length, and  $I$  the second moment of inertia of the approximated beam-like geometry.<sup>13</sup>

## Results

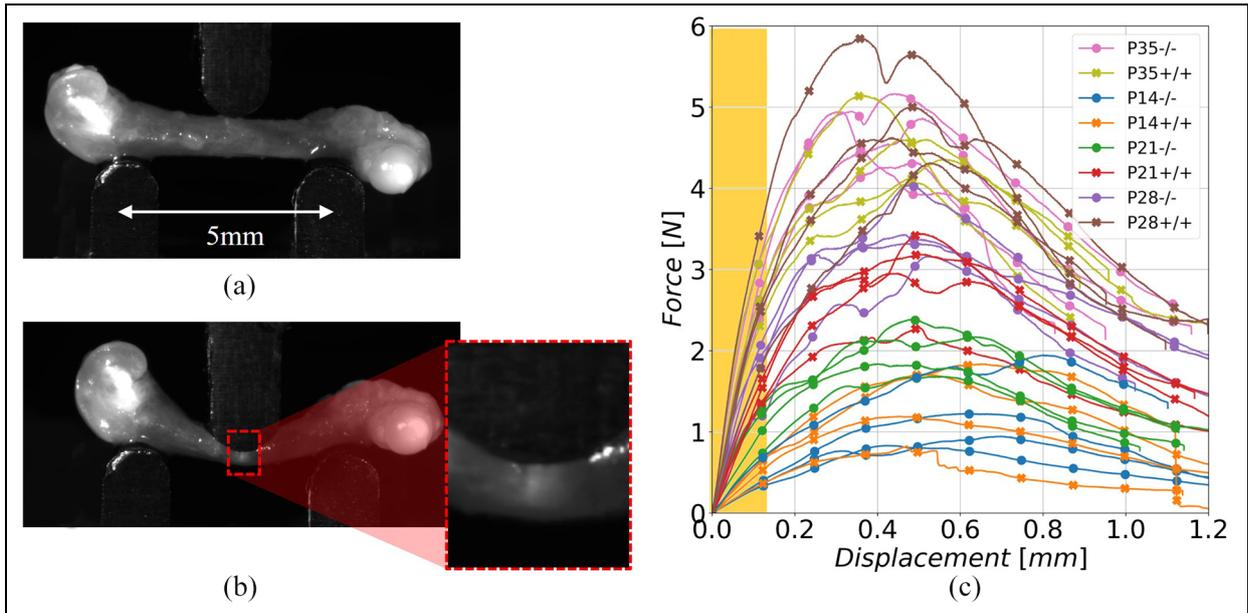
### Mechanical testing

Typical images at the beginning and the end of the prescribed displacement are represented in Figure 3(a) and (b), together with the bending response in terms of raw force-displacement curves for each tested group (Figure 3(c)).

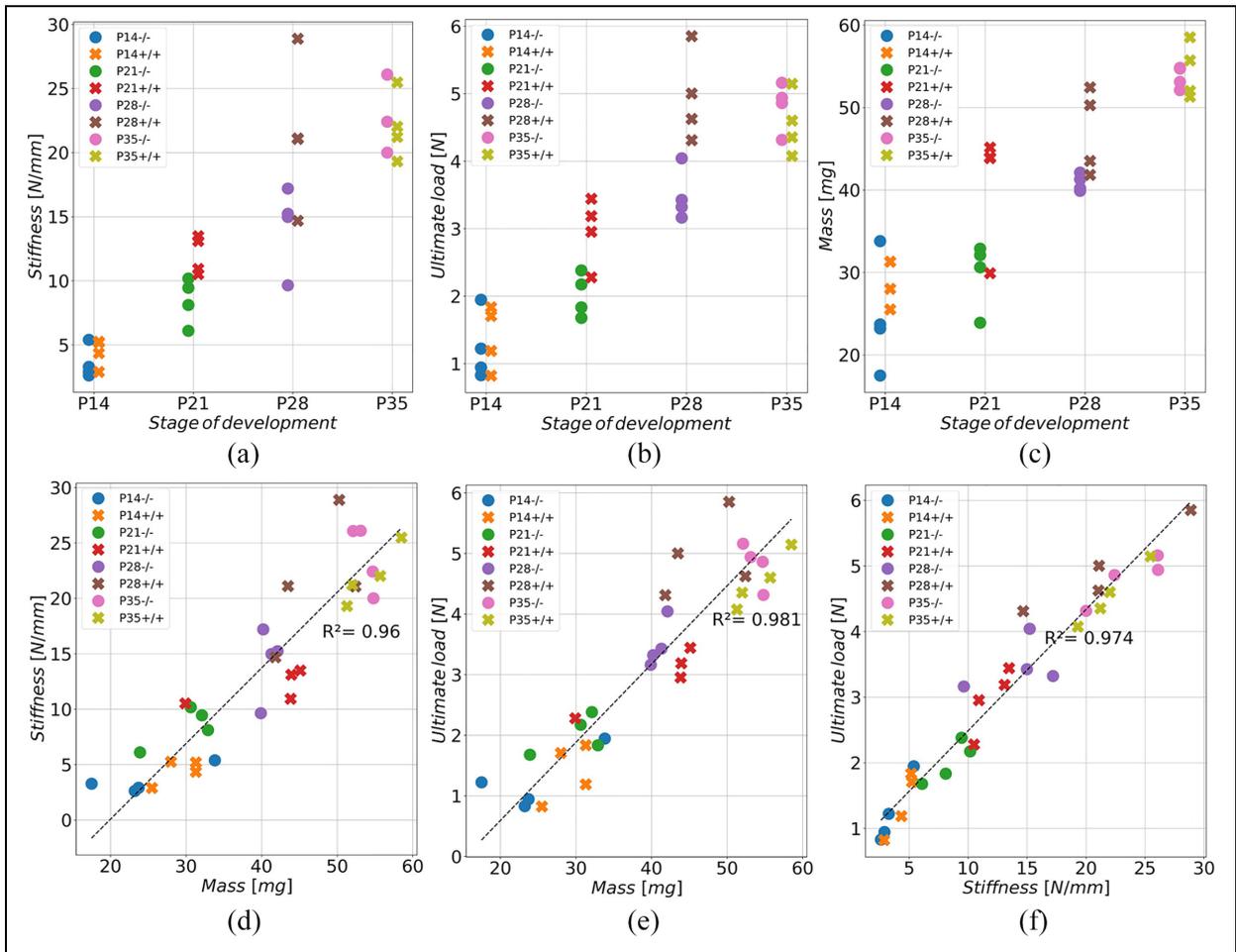
Measured bending stiffnesses for control  $Mgp^{+/+}$  samples were equal to  $4.4 \pm 0.9$ ,  $12.0 \pm 1.3$ ,  $21.4 \pm 5.0$ , and  $22.0 \pm 2.2$  N/mm at P14, P21, P28 and P35 respectively ( $n = 4$ ). For mutated  $Mgp^{-/-}$  samples, stiffnesses were equal to  $3.6 \pm 1.1$ ,  $8.5 \pm 1.6$ ,  $14.3 \pm 2.8$ , and  $23.6 \pm 2.6$  N/mm at P14, P21, P28 and P35 respectively ( $n = 4$ ). An increase of bending stiffness during growing was observed for both  $Mgp^{+/+}$  and  $Mgp^{-/-}$  groups, as emphasized in Figure 4(a). Slight differences were observed between  $Mgp^{+/+}$  and  $Mgp^{-/-}$  for P14, P28 and P35, while a more pronounced difference was observed at P21. The same trend and significance were observed for ultimate load (Figure 4(b)), with differences observed between  $Mgp^{+/+}$  and  $Mgp^{-/-}$  groups at P21 and P28. Masses also followed the same trend (Figure 4(c)), with visible differences for P21 and P28. Clearly linear correlations were found between stiffness and mass (Figure 4(d)), ultimate load and mass (Figure 4(e) and ultimate load and stiffness (Figure 4(f)), indicating that the information concerning the evolution of structural mechanical properties may be contained into the measure of sample mass, and also emphasizing that the mechanisms underlying the evolution of structural mechanical properties have the same consequences on stiffness and ultimate loads.

### $\mu$ CT analysis

$\mu$ CT were performed on 16 samples (eight groups,  $n = 2$  for each group) and associated tetrahedral meshes were prepared for FE simulations as illustrated on Figure 5. The reconstructed meshes were used to compute the lengths, external and cortical volumes, and second moment of area of each reconstructed sample (Figure 6). A clear increase in bone external volumes and lengths were observed during growing, and a difference was observed between  $Mgp^{+/+}$  and  $Mgp^{-/-}$  groups slightly at P21 and more visibly at P28 (to be considered in the light of the very small sample size however).



**Figure 3.** Femurs mounted on the bending stand at the beginning (a) and the end (b) of the prescribed displacement. Local gray level change due to damage, as commonly reported, is emphasized in the insert. (c) Raw force-displacement curves for each tested group ( $n = 4$ ). The yellow zone emphasizes the region for stiffness evaluation from linear regression of force-displacement response.



**Figure 4.** Distribution of bending stiffness (a), ultimate load (b), and measured mass (c) for each tested group ( $n = 4$ ). Relation between mass and stiffness (d), mass and ultimate load (e) and ultimate load, and stiffness (f) with linear regression.

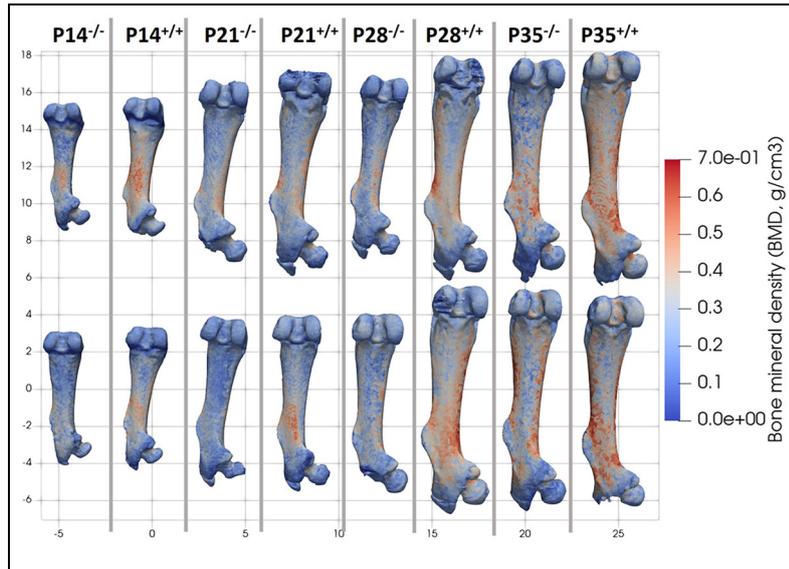


Figure 5.  $\mu$ CT reconstructions with local assignment of BMD from calibrated  $\mu$ CT data (scale in mm).

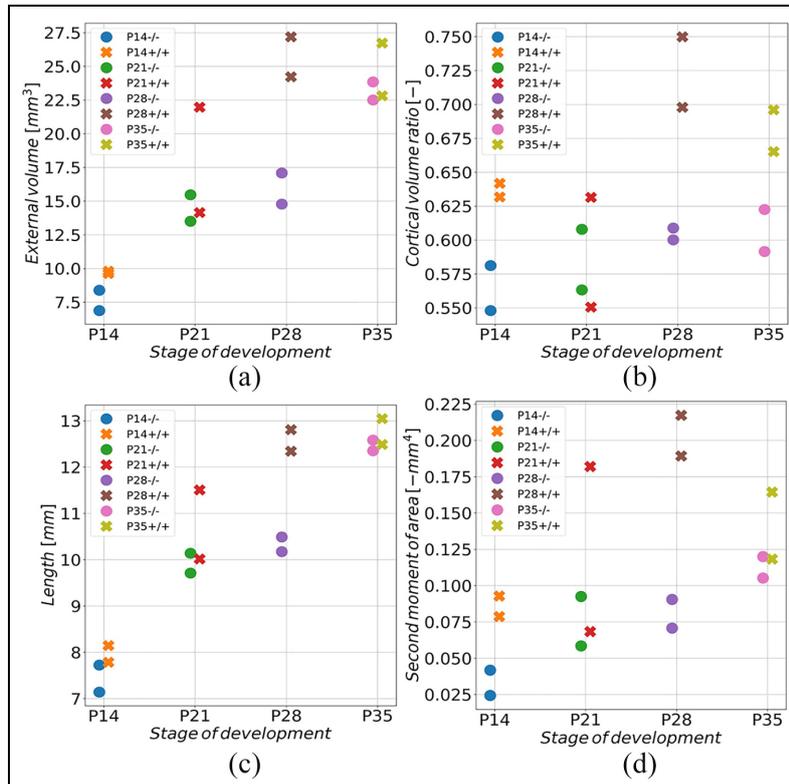
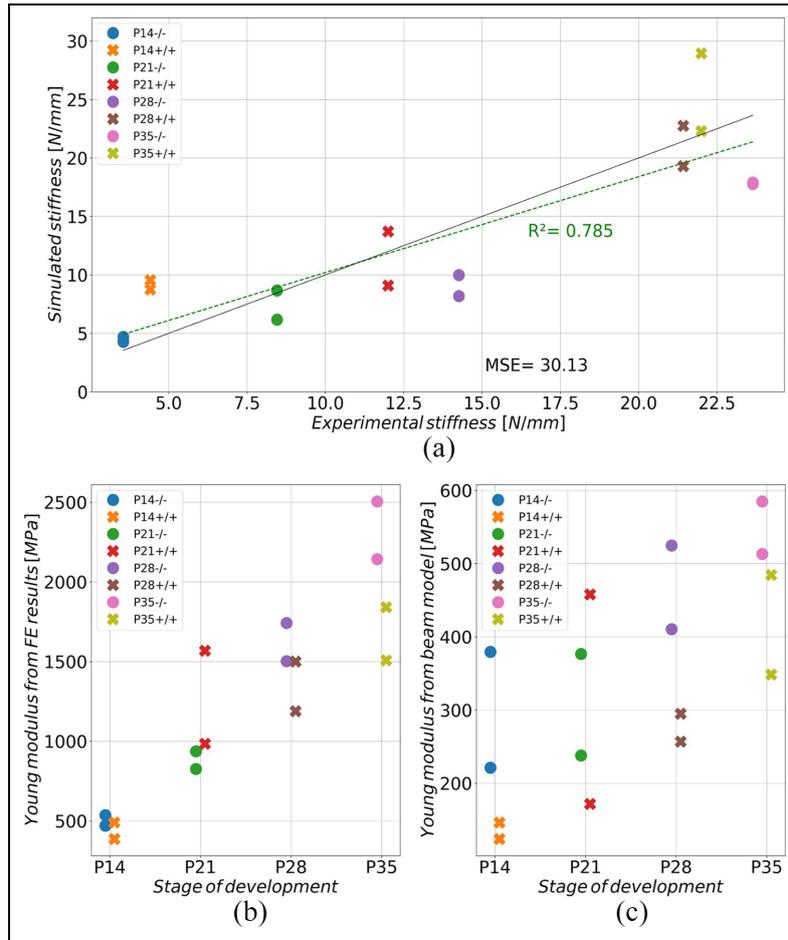


Figure 6. Distribution of external femur volume (a), ratio between volume of cortical bone and external volume (b), femur length (c) and (d) second moment of inertia computed from  $\mu$ CT reconstructions for each group as a function of the stage of development ( $n = 2$ ).

Simulation results

Two types of simulations were performed. In the first case, density-dependent material properties were assigned and the best density-elasticity relationship on the form of a power law was identified by minimizing the MSE between predicted and experimental stiffness for the whole set of samples. The correlation between

predictions and experimental values for the best density-elasticity relationship, and the associated errors, are illustrated in Figure 7(a). Experimental and simulated stiffness were not strongly correlated ( $R^2 = 0.785$ ), indicating that some other parameters than BMD may influence the local Young’s modulus. The corresponding density-elasticity relationship was



**Figure 7.** (a) Comparison between predicted and measured bending stiffnesses from the best identified density-elasticity relationship  $E = 24.77\rho^{15.18}$  MPa. The black line represents the ideal prediction, while the dashed green line represents the linear regression of the simulated versus experimental stiffness. Errors are given in terms of Mean Squared Error (MSE). Remark: points for P35<sup>-/-</sup> are nearly superposed. (b) Young moduli identified from FE results for each simulated group ( $n = 2$ ) as a function of the stage of development. (c) Young moduli identified from a beam model approximation for each simulated group ( $n = 2$ ) as a function of the stage of development.

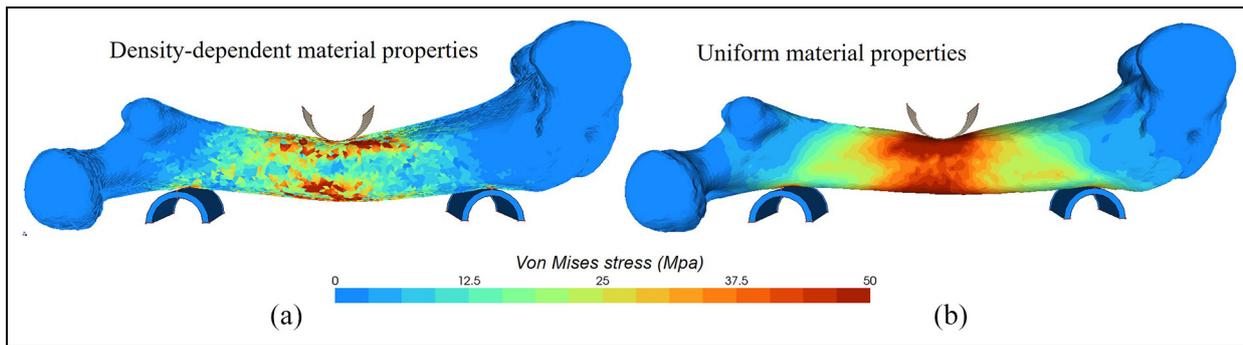
$E = 24.77\rho^{15.18}$ , with therefore a strongly nonlinear relation between density and Young’s modulus. Such a unique relation resulted in a substantial overestimation of material properties for some groups (P14<sup>+/+</sup>) while it resulted in an underestimation for some other groups (P28<sup>-/-</sup>, P35<sup>-/-</sup>). The assignment of density-dependent material properties resulted in clearly heterogeneous stress distribution within the bone during the bending test, as emphasized in Figure 8(a).

In the second case (Figure 7(b)), uniform material properties for cortical bone were identified for each sample in such a way that the FE prediction of bending stiffness was equal to experimental value. Such uniform properties obviously resulted in more homogeneous stress distribution within the cortical bone during the bending test (Figure 8(b)), with however strong variations along the bone length. The identified Young’s moduli for each group are illustrated in Figure 7(b), emphasizing a clear increase in overall Young’s modulus as a function of the development stage. Differences were observed between Mgp<sup>+/+</sup> and Mgp<sup>-/-</sup> groups,

indicating that the Young’s modulus may be higher for Mgp<sup>-/-</sup> samples than for Mgp<sup>+/+</sup> samples from P28. Once again, such conclusions are however to be placed in the light of the very small sample size ( $n = 2$ ) used at the basis of the FE simulations. In opposition to this subject-specific approach, common relations issued from beam theory (equation (1)) were used to identify Young’s moduli from the experimental bending response (Figure 7(c)). While the differences between Mgp<sup>+/+</sup> and Mgp<sup>-/-</sup> groups followed the same trend that for FE-based identification, the obtained values of Young’s moduli were up to four times lower than the previous values.

### Discussion

The main objective of this study was to provide preliminary data concerning the changes in material and structural mechanical properties of control (that can be assimilated to wild-type) and Mgp-deficient mice at the early stages of postnatal development, in order to



**Figure 8.** Distribution of equivalent Von Mises stress (MPa) within the bone in the case of density-dependent material properties (a) and uniform material properties (b).

investigate the effect of the growth of a low bone mass phenotype on these properties. In the first part of the study, structural properties have been identified from experimental three-points bending tests at different stages of development and our results highlight that MGP deficiency may be associated with a reduction of femur bending stiffness as well as ultimate load at P21 and P28, but not at P14 and P35. The experimental bending stiffnesses obtained in the present study, during early stages of development, are obviously lower than previously reported values all obtained in adult animals and shown to vary with age and to be depend on strains. For instance, bending stiffness of  $99.2 \pm 5.1$  N/mm have been stated at 6 months old (= P180) for wild-type C57BL/6 mice,<sup>10</sup> which is almost four times higher than the value of  $22.0 \pm 2.2$  N/mm we obtained in the current study for control P35 mice of the same background. Comparable values higher than 100 N/mm have also been reported for ages ranged from 6 to 22 months, with a significant decrease with age.<sup>11</sup> At 20 weeks old (P140), the femur bending stiffness have been reported to be in the 40–65 N/mm range depending on the mouse strain.<sup>12</sup> Due to the typical growth pattern observed for mouse femur up to 6 months,<sup>22</sup> it is therefore not surprising that the structural properties presented in the present study are substantially lower than previously reported values since the tested samples were at very early stages of postnatal development. The same conclusions may be drawn for ultimate loads, with a four-fold difference between reported values at 6 months and the present study (5 weeks maximum, P35).<sup>10</sup>

Such results concerning macroscopic structural properties of bone may be related to changes in bone morphological properties or material properties, or a combination of both. These interrelated changes may be difficult to decorrelate, since “small change in body size may be associated with significant changes in whole-bone mechanical properties, morphology and, less obviously, tissue-level mechanical properties.”<sup>8</sup> Morphological and material changes may be indeed coupled in such a way that a given stress is maintained within the bone. Indeed, it has been for instance

proposed that geometrical changes occur at a given age to compensate for the detrimental effect of a decrease in bone material properties.<sup>28</sup> In the present study, the morphological changes have been therefore investigated from  $\mu$ CT acquisitions, and the material properties have also been identified from a subject-specific finite element approach. Our results emphasize an increase over time of morphological properties of bone, that have been reported to follow a growth-like curve.<sup>17,22</sup> Our results seem to point out a difference in bone length, external volume, second moment of area and cortical volume between  $Mgp^{+/+}$  and  $Mgp^{-/-}$  groups from P21 and particularly at P28, in accordance with previous observations.<sup>1</sup> The identification of material properties from simulations have permitted to emphasize that material properties evolve in the opposite direction compared to dimensions between  $Mgp^{+/+}$  and  $Mgp^{-/-}$  groups, with higher identified Young’s modulus for the femurs of  $MGP$ -deficient mice. The combination of a lower cortical volume and higher material properties may explain the comparable overall structural properties observed at P35 between both groups.

In contrast with the current state of art concerning the biomechanical investigation of murine bone properties, these differences on material properties have been emphasized by making use of a subject-specific finite element analysis in order to overcome some of the limitations of the common reported approaches based on beam theory. Indeed, it has been clearly pointed out in previous studies<sup>13</sup> that the classical equations of bending beams should not be used if the length of the sample is not sufficiently long compared to its diameter. Consequently, for small bone samples such as the femurs considered in the present study, commonly reported investigation of bone “bending modulus” or Young’s modulus may be associated to substantial errors. Alternatively, FE simulations have also been used in order to compute overall bone mechanical properties from the exact description of bone micro-architecture,<sup>10</sup> assuming an arbitrary given value for elastic material properties of bone, which may explain the low correlation coefficient between FE predictions

and actual bending stiffness. The limitations of such beam-based approaches have been pointed out in the present study, since difference up to fourfold were observed between the previously validated FE simulations<sup>18</sup> and an identification based on a beam model, as reported previously.<sup>13</sup> These results are consistent with the underestimation by a factor 2–6 pointed out in recent studies when assessing Young modulus from whole-bone biomechanical testing.<sup>8</sup> The FE approach described in the present study permitted to separate structural properties from material properties without making any debatable assumption on the beam-like geometry of the bones.

As far as the assignment of material properties is concerned, several cases have been considered. In a first case, density-dependent material properties have been identified from a unique density-elasticity relation for all groups, on the form of a power law initially based on the BMD calibrated in the CT volume. The identified power law parameters were obviously different from the common reported relationships<sup>19–21</sup> as a result of the early stages of development of samples associated with poor mineralization compared to the frequently tested specimen in the literature. The best-fitted density-elasticity relationship did not result in strong correlations between experimental and simulated results, with errors that tend to underestimate the material properties of *Mgp*-deficient mice compared to control mice. This suggests that BMD may not constitute a sufficient indicator of the bone material properties, and that other factors of bone quality should be considered. Indeed, it has been largely reported that the bone mineral phase was not fully responsible of bone overall properties, since the organic phase and collagen organization plays a significant role in bone toughness for instance.<sup>10,29–31</sup> Former studies on a murine model have reported very low relationship between bone density and Young modulus in some cases.<sup>22</sup> Further studies may therefore include a quantification of bone quality at various scales as recently reported<sup>10</sup> in order to investigate the microscopic changes in bone composition and structure due to MGP deficiency. It is indeed likely that the deficiency in MGP, known as a calcification inhibitor,<sup>32</sup> may not affect only the BMD but also the quality of the overall bone tissue. Forthcoming histological analyses performed on the two remaining left samples for each group (thus excluded from the present study) will aim at providing additional information concerning the changes of composition and organization of bone.

The present study is obviously associated with a number of limitations that will be discussed subsequently. Firstly, and uppermost, the difficulty of collecting numerous MGP-deficient samples due to early lethality restrict the conclusions of the present study to a very small sample size, and no statistically significant conclusions can thus be drawn. However, the present study highlighted some clear trends even for this limited number of samples, providing a trustworthy procedure that will be enriched and improved in subsequent

studies. In order to reduce the use of animal models, the present contribution also lays the foundation of a new approach based on non-invasive computational simulation that may be largely extended in the future to other tissues or pathologies. It seems important to point out that the conclusions drawn in the present study may not be extended neither to general skeletal properties nor to every mouse strains, since it has been reported that mouse bone properties vary from one anatomical site to another<sup>11,12</sup> and from one strain to another.<sup>12</sup> Secondly, the influence of gender was not included. Although no differences in the pathophysiological phenotype between *Mgp*<sup>+/+</sup> and *Mgp*<sup>-/-</sup> have ever been reported, a potential difference between males and females in the effect of *Mgp* mutation on material and structural mechanical properties cannot be excluded. It has been reported that such sexual differences may exist with advanced aging on mice skeletal properties,<sup>11,33</sup> and the extension of these differences to animals in early stages of development may be investigated in future studies. Thirdly, the material properties were assessed at the tissue (macro) level with a continuum assumption, with no description of bone micro-architecture. Nevertheless, it has been largely pointed out that bone microstructure is a major indicator of its apparent stiffness<sup>34,35</sup> and toughness,<sup>36,37</sup> which has motivated the emergence of micro-FE models despite of their limitations.<sup>38</sup> Further studies regarding the effect of MGP-deficiency on bone micro-architecture may be developed in the future, by making use of high-resolution CT volume for instance. However, due to the poor calcification of bone at such early stages of bones,  $\mu$ CT should be combined with additional imaging procedure (such as high-resolution magnetic resonance imaging<sup>39</sup>) to provide with reliable information on non-calcified regions of bones. Moreover, in order to validate the identified material properties and provide additional information concerning local bone properties, further investigation including SAXS/WAXS<sup>40</sup> or nanoindentation<sup>41</sup> constitute obvious and promising perspectives of the present work. Recent work has however suggested that porosity (included in the apparent bone density considered in the present contribution) may be a sufficient indicator at the first order to draw conclusions on bone apparent properties.<sup>42</sup> Lastly, bone obviously exhibits a complex mechanical behavior involving anisotropic elasticity, yield, damage, fatigue, and fracture that have been extensively studied and described for both trabecular and cortical bones (for a recent review, see for instance<sup>43</sup>). We voluntarily limited our analyses of experimental and simulated bending responses to the bending stiffness in the elastic range, even if information regarding yield (Figure 3(c)) are available in the data. Indeed, in the case of three-points bending tests, yield mainly occur at the level of the contact between the loaders and bone<sup>12,13</sup> and local information may therefore not be rigorously extracted from overall curves. Alternatively, in forthcoming studies, local information about bone damage might be

extracted from visible whitening (Figure 3(b)) as proposed in the literature,<sup>44</sup> and furtherly compared to FE predictions from the assumption of a 2D sample.<sup>9</sup> Such a procedure applied to three-dimensional bones may however require substantial additional development for the 3D localization of whitening.

## Conclusion

By using an original mouse model that quickly develops after birth low bone mass and delayed bone growth (*Mgp*<sup>-/-</sup> mice) when compared to its control (*Mgp*<sup>+/+</sup>, comparable to wild-type mice), we present an original subject-specific computational approach that avoids some of the reported limitations concerning the use of beam-like assumptions for small bone samples, and we highlighted the differences between both approaches. The present study emphasizes, for the very first time, that MGP-deficiency results in differences in both structural and material properties of femurs during early stages of development. In addition, our exploratory results indicate that MGP-deficiency, associated with lower bone dimensions, exhibit compensation by higher material properties which results in similar structural bone properties at P35. Overall, the weak predictions issued from the search of a unique density-elasticity relationship suggest that MGP-deficiency may affect bone tissue in several ways, that may not be represented uniquely from the quantification of bone mineral density.

## Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

## Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was funded by the “interdisciplinarity” grant ESCALE from the *Université de Lorraine* and the PEERL grant 04-2019 from the *Fondation des Gueules Cassées*.

## ORCID iDs

Cédric Laurent  <https://orcid.org/0000-0002-7121-5522>  
Adrien Baldit  <https://orcid.org/0000-0002-1675-5681>

## Supplemental material

Supplemental material for this article is available online.

## References

1. Luo G, Ducy P, McKee MD, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997; 386: 78–81.
2. Murshed M, Schinke T, McKee MD, et al. Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two Gla-containing proteins. *J Cell Biol* 2004; 165: 625–630.
3. Leroux-Berger M, Queguiner I, Maciel TT, et al. Pathologic calcification of adult vascular smooth muscle cells differs on their crest or mesodermal embryonic origin. *J Bone Miner Res* 2011; 26: 1543–1553.
4. Marulanda J, Gao C, Roman H, et al. Prevention of arterial calcification corrects the low bone mass phenotype in MGP-deficient mice. *Bone* 2013; 57: 499–508.
5. Zhang J, Ma Z, Yan K, et al. Matrix Gla protein promotes the bone formation by up-regulating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Front Endocrinol* 2019; 10: 891.
6. Zhang Y, Zhao L, Wang N, et al. Unexpected role of matrix Gla protein in osteoclasts: inhibiting osteoclast differentiation and bone resorption. *Mol Cell Biol* 2019; 39: e00012–e00019.
7. Follet H, Boivin G, Rumelhart C, et al. The degree of mineralization is a determinant of bone strength: a study on human calcanei. *Bone* 2004; 34: 783–789.
8. Jepsen KJ, Silva MJ, Vashishth D, et al. Establishing biomechanical mechanisms in mouse models: practical guidelines for systematically evaluating phenotypic changes in the diaphyses of long bones. *J Bone Miner Res* 2015; 30: 951–966.
9. Ridha H and Turner PJ. Finite element prediction with experimental validation of damage distribution in single trabeculae during three-point bending tests. *J Mech Behav Biomed Mater* 2013; 27: 94–106.
10. Heveran CM, Schurman CA, Acevedo C, et al. Chronic kidney disease and aging differentially diminish bone material and microarchitecture in C57Bl/6 mice. *Bone* 2019; 127: 91–103.
11. Mumtaz H, Dallas M, Begonia M, et al. Age-related and sex-specific effects on architectural properties and biomechanical response of the C57BL/6N mouse femur, tibia and ulna. *Bone Rep* 2020; 12: 100266.
12. Schriefer JL, Robling AG, Warden SJ, et al. A comparison of mechanical properties derived from multiple skeletal sites in mice. *J Biomech* 2005; 38: 467–475.
13. Turner CH and Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone* 1993; 14: 595–608.
14. Bozzini C, Bozzini CE and Alippi RM. Biomechanical properties of femoral shafts and bone tissue in protein-malnourished rats from weaning to adulthood. *Comp Clin Pathol* 2012; 21: 1159–1165.
15. Jørgensen PH, Bak B and Andreassen TT. Mechanical properties and biochemical composition of rat cortical femur and tibia after long-term treatment with biosynthetic human growth hormone. *Bone* 1991; 12: 353–359.
16. LaMothe JM, Hepple RT and Zernicke RF. Selected contribution: bone adaptation with aging and long-term caloric restriction in Fischer 344  $\times$  brown-Norway fl-hybrid rats. *J Appl Physiol (1985)* 2003; 95: 1739–1745.
17. Brodt MD, Ellis CB and Silva MJ. Growing C57Bl/6 mice increase whole bone mechanical properties by increasing geometric and material properties. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 2159–2166.
18. Laurent CP, Böhme B, Mengoni M, et al. Prediction of the mechanical response of canine humerus to three-point bending using subject-specific finite element modelling. *Proc Inst Mech Eng H* 2016; 230: 639–649.

19. Helgason B, Perilli E, Schileo E, et al. Mathematical relationships between bone density and mechanical properties: a literature review. *Clin Biomech* 2008; 23: 135–146.
20. Nobakhti S and Shefelbine SJ. On the relation of bone mineral density and the elastic modulus in healthy and Pathologic Bone. *Curr Osteoporos Rep* 2018; 16: 404–410.
21. Rho JY, Hobatho MC and Ashman RB. Relations of mechanical properties to density and CT numbers in human bone. *Med Eng Phys* 1995; 17: 347–355.
22. Somerville JM, Aspden RM, Armour KE, et al. Growth of C57Bl/6 mice and the material and mechanical properties of cortical bone from the tibia. *Calcif Tissue Int* 2004; 74: 469–475.
23. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 2010; 25: 1468–1486.
24. Si H. TetGen, a Delaunay-based quality tetrahedral mesh generator. *ACM Trans Math Softw* 2015; 41(2): 1–36.
25. Sullivan C and Kaszynski A. PyVista: 3D plotting and mesh analysis through a streamlined interface for the visualization toolkit (VTK). *J Open Source Softw* 2019; 4: 1450.
26. Laurent CP, Böhme B, Verwaerde J, et al. Effect of orthopedic implants on canine long bone compression stiffness: a combined experimental and computational approach. *Proc Inst Mech Eng H* 2020; 234: 255–264.
27. Jeunechamps P-P and Ponthot J-P. An efficient 3D implicit approach for the thermomechanical simulation of elastic-viscoplastic materials submitted to high strain rate and damage. *Int J Numer Methods Eng* 2013; 94: 920–960.
28. Ferguson VL, Ayers RA, Bateman TA, et al. Bone development and age-related bone loss in male C57BL/6J mice. *Bone* 2003; 33: 387–398.
29. Iwasaki Y, Kazama JJ, Yamato H, et al. Altered material properties are responsible for bone fragility in rats with chronic kidney injury. *Bone* 2015; 81: 247–254.
30. Nyman JS, Roy A, Acuna RL, et al. Age-related effect on the concentration of collagen crosslinks in human osteonal and interstitial bone tissue. *Bone* 2006; 39: 1210–1217.
31. Zimmermann EA and Ritchie RO. Bone as a structural material. *Adv Healthc Mater* 2015; 4: 1287–1304.
32. Kornak U. Animal models with pathological mineralization phenotypes. *Joint Bone Spine* 2011; 78: 561–567.
33. Haffner-Luntzer M, Fischer V and Ignatius A. Differences in fracture healing between female and male C57BL/6J mice. *Front Physiol* 2021; 12: 712494.
34. Cai X, Follet H, Peralta L, et al. Anisotropic elastic properties of human femoral cortical bone and relationships with composition and microstructure in elderly. *Acta Biomater* 2019; 90: 254–266.
35. Bala Y, Lefèvre E, Roux J-P, et al. Pore network micro-architecture influences human cortical bone elasticity during growth and aging. *J Mech Behav Biomed Mater* 2016; 63: 164–173.
36. Gustafsson A, Wallin M and Isaksson H. The influence of microstructure on crack propagation in cortical bone at the mesoscale. *J Biomech* 2020; 112: 110020.
37. Sabet FA, Raeisi Najafi A, Hamed E, et al. Modelling of bone fracture and strength at different length scales: a review. *Interface Focus* 2016; 6: 20150055.
38. Arias-Moreno AJ, Ito K and van Rietbergen B. Micro-finite element analysis will overestimate the compressive stiffness of fractured cancellous bone. *J Biomech* 2016; 49: 2613–2618.
39. Singh S, Bray TJP and Hall-Craggs MA. Quantifying bone structure, micro-architecture, and pathophysiology with MRI. *Clin Radiol* 2018; 73: 221–230.
40. Turunen MJ, Kaspersen JD, Olsson U, et al. Bone mineral crystal size and organization vary across mature rat bone cortex. *J Struct Biol* 2016; 195: 337–344.
41. Casanova M, Balmelli A, Carnelli D, et al. Nanoindentation analysis of the micromechanical anisotropy in mouse cortical bone. *R Soc Open Sci* 2017; 4: 160971.
42. Cai X, Brenner R, Peralta L, et al. Homogenization of cortical bone reveals that the organization and shape of pores marginally affect elasticity. *J R Soc Interface* 2019; 16: 20180911.
43. Morgan EF, Unnikrisnan GU and Hussein AI. Annual review of biomedical engineering. In: Yamush ML (ed.) *Bone mechanical properties in healthy and diseased states*. Palo Alto: Annual Reviews, 2018, pp.119–143, Vol. 20.
44. Thurner PJ, Erickson B, Jungmann R, et al. High-speed photography of compressed human trabecular bone correlates whitening to microscopic damage. *Eng Fract Mech* 2007; 74: 1928–1941.





# Résumé

## Rôle de la protéine matricielle Gla dans le développement du cartilage sain et pathologique

Dans les os longs, le développement du tissu osseux prend place au niveau d'une structure cartilagineuse hautement spécialisée et organisée nommée plaque de croissance. Le cartilage de croissance est localisé au niveau de chaque extrémité osseuse nommée épiphyses. Lors du développement embryonnaire, les chondrocytes arrondis quiescents vont proliférer et s'arranger en colonnes avant d'entrer en phase de maturation, ce qui aboutira à leur hypertrophie. Alors, les chondrocytes hypertrophiques vont induire la dégradation de la matrice extracellulaire et l'invasion vasculaire du cartilage de croissance par des cellules des lignées ostéoblastiques et ostéoclastiques. Enfin, les chondrocytes hypertrophiques terminaux entreront en apoptose ou se trans-différencieront en ostéoblastes.

La régulation de la plaque de croissance est un processus complexe qui requiert l'implication de nombreux acteurs moléculaires, parmi lesquels se trouve la protéine matricielle Gla.

La protéine matricielle Gla (MGP) est une protéine de petite taille principalement exprimée au niveau du cartilage, des artères, des veines, de la trachée et des poumons. MGP est un membre de la famille des protéines vitamine K dépendantes (VKDPs) et est alors caractérisée par la présence de résidus glutamates modifiés post-traductionnellement, les résidus  $\gamma$ -carboxyglutamates (Gla). Les résidus Gla permettent à MGP de se lier directement aux ions calcium, aux cristaux calciques et à la protéine BMP2 (Bone morphogenic protein 2) afin d'inhiber le processus de minéralisation des tissus. Les souris MGP KO, modèle murin de la déficience en MGP, présentent des calcifications anormales au niveau des artères et de plusieurs cartilages, associées à un dysmorphisme crânio-facial et un retard de croissance modéré. L'étude du phénotype artériel et de l'hypoplasie médio-faciale a permis de mettre en évidence le rôle majeur que joue MGP dans l'inhibition de calcifications pathologiques. A l'inverse, des études suggèrent que le retard de croissance observé chez les souris MGP KO n'est pas lié aux calcifications anormales qu'elles développent. Enfin, des études récentes ont associé des polymorphismes du gène codant MGP avec le développement d'arthrose (OA).

C'est dans ce contexte, que ce projet de thèse s'est proposé, pour la toute première fois, d'étudier de manière précise les altérations de la plaque de croissance des souris MGP KO ainsi que le développement d'arthrose chez des souris hétérozygotes pour le gène MGP.

Mots-clés : Plaque de croissance, chondrocytes, Matrix Gla protein (MGP), développement post-natal, arthrose

## Abstract

### Role of Matrix Gla Protein in cartilage

In long bones, bone development take place within a highly specialized and structured termed growth plate. This structure is located at each extremity of long bones, called epiphysis. During embryonic development, within growth plate, rounded resting chondrocytes will start to proliferate and take a columnar arrangement, before undergoing maturation that will results in their hypertrophy. Thus, hypertrophic chondrocytes will participate to matrix degradation and vascular invasion of cartilage by cells from osteoblastic and osteoclastic lineage. Finally late terminal hypertrophic chondrocytes will either undergo apoptosis or trans-differentiate into osteoblasts.

Regulation of growth plate development requires several signaling pathways and molecular actors which include Matrix Gla protein.

Matrix Gla protein is a small protein mainly expressed in cartilages, arteries, veins, trachea, and lungs. MGP belong to the Vitamin K dependent family (VKDPs) and so, it is characterized by the presence of  $\gamma$ -carboxyglutamate (Gla) residues. Those Gla residues allow MGP to directly bind calcium ions, calcium containing crystals or Bone morphogenic protein 2 (BMP2) to inhibit mineralization of soft tissue. Experimental model of MGP deficiency, MGP KO mice exhibit extensive calcification of arteries, abnormal calcification of cartilages associated with midface hypoplasia and moderate growth retardation. Studies of vascular and craniofacial phenotypes have confirmed the major role of MGP in the inhibition of ectopic calcifications. In contrast, the growth retardation observed in absence of MGP appears not to be linked to abnormal calcification but remains largely understudied. Recent studies have also associated MGP gene polymorphisms with osteoarthritis (OA) development.

In this context, we proposed, for the very first time, to study and describe the growth plate cartilage of MGP KO mice as well as osteoarthritis development in MGP heterozygous mice.

Keywords : Growth plate, chondrocytes, Matrix Gla protein (MGP) post-natal development, osteoarthritis