

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

INFLUENCE DE L'HÉMINE SUR L'OSTÉOCLASTOGÉNÈSE ET SUR LA PERSISTANCE ET LA
RÉSORPTION DES OSTÉOCLASTES MATURES.

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ(E)

COMME EXIGENCE PARTIELLE

POUR LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

NICOLAS POUDEROUS

NOVEMBRE 2023

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.04-2020). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier ma directrice de recherche Tatiana Scorza pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser mon mémoire au sein de son laboratoire ainsi que pour son soutien quotidien. La réalisation de cette maîtrise et les deux années passées au sein de son laboratoire m'ont permis d'évoluer tant bien sur le plan professionnel, en acquérant plus de connaissances techniques et théoriques, que sur le plan personnel. Car en recherche tout ne fonctionne pas du premier coup, j'ai été confronté à de nombreux contretemps, éléments qui ne fonctionnaient pas comme prévu, mais j'ai continué à travailler, persévérer et j'ai utilisé ces « échecs » comme chemin vers ma réussite. Cela est une belle leçon analogue à la vie de tous les jours, on aura toujours des obstacles, des imprévus, mais il ne faut pas s'arrêter là, il faut persévérer, chaque obstacle ou échec ne doit pas être vu comme une finalité, mais plutôt comme un moyen de se surpasser et d'évoluer.

Je tiens également à remercier mes collègues de laboratoire pour leur présence et leur bonne humeur. Phillipe Saint-Louis pour son soutien constant lors de ma première année de maîtrise, ainsi que les bons burgers partagés après une bonne journée de travail. Ainsi que ma collègue Arleth Pozo De Lugo pour ses conseils.

Je veux aussi remercier la plateforme de microscopie et d'analyse cellulaire et particulièrement Denis Flipo ainsi que Grégoire Bonnamour pour l'ensemble de leurs conseils et le partage de leur expertise qui m'ont été d'une grande aide lors de la programmation et réalisation de diverses manipulations.

Je compte aussi remercier l'ensemble des techniciens du pavillon des sciences biologiques, et notamment Marie-Josée et Serge Paquet pour leur disponibilité et leur efficacité lors de la réalisation des démonstrations en laboratoires.

Enfin, je tenais à remercier ma famille qui m'a toujours soutenu dans l'ensemble de mes projets et qui m'a permis de me consacrer pleinement à la réalisation de ma maîtrise.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	ii
LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	vii
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS.....	viii
RÉSUMÉ.....	ix
ABSTRACT.....	x
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	3
1.1 Le remodelage osseux.....	3
1.2 Les ostéoclastes.....	4
1.2.1 Origine des ostéoclastes.....	4
1.2.2 Formation des ostéoclastes.....	4
1.2.3 Mécanismes impliqués dans la résorption osseuse par les ostéoclastes.....	7
1.2.4 Rôle de la fission chez les ostéoclastes.....	10
1.3 Les ostéoblastes.....	10
1.3.1 Origine et rôle des ostéoblastes.....	10
1.3.2 Formation et rôle des cellules du revêtement osseux.....	11
1.3.3 Formation et rôle des ostéocytes.....	12
1.4 Autres mécanismes de régulation du remodelage osseux.....	13
1.5 Les conditions hémolytiques.....	13
1.5.1 Structure et catabolisme de l'hème.....	15
1.5.2 Le rôle de l'hème oxygénase.....	16
1.5.3 Effets délétères de l'hème libre.....	18
1.6 La dérégulation du remodelage osseux :.....	19
1.6.1 Lors du vieillissement cellulaire.....	19
1.6.1.1 La sénescence.....	19
1.6.1.2 Relation entre la sénescence et l'environnement osseux.....	20
1.6.2 Lors de conditions hémolytiques.....	21
1.6.3 Hypothèse et objectifs.....	23
CHAPITRE 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	24
2.1 Modèle animal.....	24
2.2 Culture cellulaire, génération et traitement des ostéoclastes <i>in vitro</i> (lignée cellulaire).....	24

2.3 Culture cellulaire, génération et traitement des macrophages et ostéoclastes <i>in vitro</i> (cellules primaires, souris BALB/c femelle).....	24
2.3.1 Différenciation ostéoclastique.....	24
2.3.2 Production de macrophages.....	25
2.4 Stratégie d'identification des ostéoclastes	26
2.5 Production de M-CSF par la lignée fibroblastique L929.....	27
2.6 Préparation de l'HE	27
2.7 Marquage phosphatase acide tartrate-résistante (TRAP)	27
2.8 Marquage des cellules sénescents.....	28
2.9 Analyse des transcrits par RT-PCR	28
2.10 Migration cellulaire des RAW 264.7	28
2.11 Production de matrice minéralisée (Calcium-Phosphate)	29
2.12 Marquage de la matrice	30
2.13 Quantification et analyse de la résorption sur matrice de phosphate de calcium.....	30
2.14 Analyse des données de résorptions par Excel	32
2.15 Analyse statistique.....	33
CHAPITRE 3 RÉSULTATS.....	34
3.1 L'HE inhibe la différenciation des précurseurs myéloïdes en ostéoclastes <i>in vitro</i>	34
3.2 L'HE à 23 µM inhibe significativement la capacité de résorption des nouveaux ostéoclastes.	34
3.3 L'HE favorise la persistance des ostéoclastes matures	38
3.4 Une source de M-CSF et de RANKL est nécessaire pour maintenir la résorption ostéoclastique du jour 6 au jour 12.	40
3.5 L'HE inhibe partiellement la résorption des ostéoclastes matures	42
3.6 L'HE n'affecte pas la distribution des fosses de résorptions	44
3.7 L'HE n'inhibe pas la résorption des ostéoclastes matures	46
3.8 L'HE et le RANKL induisent l'adoption de certains marqueurs suggérant la sénescence chez les cellules RAW 264.7.....	48
3.9 L'HE n'affecte pas la migration des cellules RAW 264.7	49
DISCUSSION	52
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	61
ANNEXE A Séquences des amorces utilisées pour la PCR et taille attendue	65
ANNEXE B Profil de migration des amplicons sur gel d'agarose (après qPCR).....	66

ANNEXE C Génération d’ostéoclastes en présence de SL929 + RANKL à partir de macrophages différenciés.....67

ANNEXE D Cinétique de formation des ostéoclastes matures en présence de RANKL + SL929 durant 12 Jours.....68

BIBLIOGRAPHIE.....69

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Éléments et facteurs clés impliqués dans la différenciation et la formation des OSCLs matures à partir des cellules souches hématopoïétiques.....	7
Figure 1.2 Morphologie (A) et mécanismes moléculaires (B) impliqués dans la résorption osseuse (Figure modifiée tirée de : Peruzzi et al., 2011).	9
Figure 1.3 Mécanismes et enzymes impliquées dans le catabolisme de l'hémoglobine libérée dans le plasma sanguin.....	15
Figure 1.4 Structures et formules moléculaires de l'hème et de l'hémine (HE).	17
Figure 1.5 Mécanismes cataboliques de l'hème libre par la HO-1.	18
Figure 2.1 Stratégie d'identification des ostéoclastes.	26
Figure 2.2 Méthode de quantification des matrices marquées avec le rouge d'alizarine	31
Figure 2.3 Méthode de quantification des matrices marquées avec la calcéine.	32
Figure 3.1 L'HE inhibe la différenciation de précurseurs myéloïdes en ostéoclastes <i>in vitro</i>	36
Figure 3.2 À 23µM, l'HE inhibe significativement la capacité de résorption des nouveaux ostéoclastes. .	37
Figure 3.3 L'HE favorise la persistance des ostéoclastes matures.....	39
Figure 3.4 Le M-CSF et le RANKL sont nécessaires pour maintenir la résorption ostéoclastique du jour 6 au jour 12.....	41
Figure 3.5 L'HE inhibe partiellement la résorption des ostéoclastes matures.....	43
Figure 3.6 La distribution des tailles des fosses de résorption générées par les ostéoclastes matures n'est pas affectée par l'HE.....	45
Figure 3.7 L'HE n'inhibe pas la résorption des OSCLs matures.	47
Figure 3.8 L'HE et le RANKL induisent l'adoption de certains marqueurs de sénescence chez les cellules RAW 264.7.	50
Figure 3.9 L'HE n'affecte pas la migration des cellules RAW 264.7.....	51

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ALP : Phosphatase alcaline
BMU : Unité multicellulaire osseuse
CD163 : Cluster de différenciation 163
CD91 : Cluster de différenciation 91
CSHs : Cellules souches mononucléées hématopoïétiques
CSMs : Cellules souches mésenchymateuses
CTK : Cathepsine K
Eef2 : Facteur d'élongation eucaryote 2
GR : Globule rouge
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
HO : Hème oxygénase
IL : Interleukine
M-CSF : Facteur stimulant les colonies de macrophages
MMP : Métalloprotéinases
NaOH : Hydroxyde de sodium
OCN : Ostéocalcine
OPG : Ostéoprotégérine
OPN : Ostéopontine
OSBs : Ostéoblastes
OSCLs : Ostéoclastes
p21 : Inhibiteur des cyclines-kinases dépendantes 1
p53 : Protéine tumorale 53
PFA : Paraformaldéhyde
RANKL : Ligand activateur du récepteur nucléaire Nf-κB
ROS : Espèces réactives de l'oxygène
SA-β-galactosidase : Sénescence associée à la β-galactosidase
SASP : Phénotype sécrétoire associé à la sénescence
SL929 : Surnageant (exsudat) de culture de la lignée de fibroblastes L929
TRAP : Phosphatase acide tartrate résistante

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

pg/mL : picogrammes par millilitres

μm : micromètre

μM : micromolaire

RÉSUMÉ

Le remodelage osseux implique deux types de cellules : les ostéoclastes d'origine myéloïde, qui dégradent la matrice osseuse, et les ostéoblastes, d'origine mésenchymateuse, qui la forment. En condition homéostatique, un équilibre entre la destruction et la formation de l'os est maintenu, permettant la préservation de la bonne santé de nos os. Cependant, durant des conditions comme lors d'hémolyses aiguës ou chroniques (drépanocytose, thalassémie, malaria), cet équilibre est perturbé, donnant lieu à une perte et fragilisation des tissus osseux (ostéoporose). Ces perturbations sont constatées *in vivo* avec des modèles murins où l'hémolyse est induite chimiquement (phenylhydrazine), de manière infectieuse (protozoaire *Plasmodium*), mais également après l'injection d'hémine (équivalent à l'hème oxydé ; HE, protoporphyrine IX Fe³⁺). L'hémolyse s'accompagne d'une hausse de l'hème libre en circulation, corrélée à une diminution de la formation osseuse par les ostéoblastes et au maintien de la résorption osseuse des ostéoclastes. Cependant, comme dans ces conditions, une déficience de l'ostéoclastogénèse est observée, il est possible que l'HE puisse stimuler la résorption par l'intermédiaire des ostéoclastes déjà formés.

Pour mieux comprendre la nature de cet effet, nous avons généré des ostéoclastes matures à partir de précurseurs myéloïdes provenant de la moelle osseuse de souris BALB/c, pour ensuite évaluer l'impact de l'HE sur leur survie et leur capacité à dégrader une matrice minéralisée *in vitro*. Parallèlement, nous avons étudié l'influence de l'HE sur l'adoption du profil de cellule sénescence (adopté lors de l'ostéoclastogénèse) et la migration des cellules RAW 264.7, une lignée cellulaire de monocytes/macrophages. Ces éléments sont considérés comme importants pour la fonction des ostéoclastes. Nos résultats confirment que l'HE induit bien une déficience de l'ostéoclastogénèse et inhibe la dégradation de la matrice minéralisée chez les ostéoclastes en voie de différenciation. Chez les ostéoclastes matures, sa présence favorise leur durée de vie et n'a pas d'effet majeur sur leur activité de résorption osseuse. Parallèlement, l'HE tend à augmenter la sénescence chez les RAW 264.7, mais n'affecte pas significativement leur capacité à migrer.

Mots-clés : Ostéoporose, fosses de résorption, matrice minéralisée, RAW 264.7, migration.

ABSTRACT

Bone remodeling involves two types of cells: osteoclasts of myeloid origin, which degrade the bone matrix, and osteoblasts, of mesenchymal origin, which form it. In a homeostatic condition, a balance between the destruction and the formation of bone is maintained, allowing the maintenance of the good health of our bones. However, during conditions such as acute or chronic hemolysis (sickle cell disease, thalassemia, malaria), this balance is disturbed, resulting in loss and weakening of bone tissue (osteoporosis). These disturbances are observed *in vivo* with mouse models where hemolysis is induced chemically (phenylhydrazine), infectiously (protozoan Plasmodium), but also after the injection of hemin (equivalent to oxidized heme; HE, protoporphyrin IX Fe³⁺). Hemolysis is accompanied by an increase in free heme in circulation, correlated with a decrease in bone formation by osteoblasts and the maintenance of bone resorption by osteoclasts. However, as in these conditions, a deficiency in osteoclastogenesis is observed, it is possible that HE can stimulate resorption via already formed osteoclasts.

To further understand the reason for this outcome, we generated mature osteoclasts from myeloid precursors from the bone marrow of BALB/c mice and assess the impact of HE on their survival and their ability to degrade a mineralized matrix *in vitro*. In parallel, we studied the influence of HE on the adoption of the senescence cell profile (adopted during osteoclastogenesis) and the migration of RAW 264.7 cells, a monocyte/macrophage cell line. These elements are considered important for the function of osteoclasts. Our results confirm the data observed *in vivo*, that HE induces a deficiency in osteoclastogenesis and does not inhibit the degradation of the mineralized matrix in mature osteoclasts. In addition, its presence promotes the persistence of mature osteoclasts, which are more numerous compared to the control without HE. Furthermore, HE tends to increase senescence in RAW 264.7 but does not significantly affect their ability to migrate.

Keywords : Osteoporosis, resorption pit, mineralized matrix, hemin, osteoclasts.

INTRODUCTION

La bonne santé des os est assurée au quotidien par l'intermédiaire de deux types cellulaires. On retrouve les ostéoclastes (OSCLs), qui sont des cellules multinucléées d'origine myéloïde, formées à partir des cellules souches mononucléées hématopoïétiques (CSHs), et responsables de la dégradation de la matrice osseuse. Ensuite il y a l'intervention des ostéoblastes (OSBs), qui sont issus des cellules souches mésenchymateuses (CSMs) et responsables de la formation d'une matrice minéralisée *de novo*. Les OSBs peuvent également se différencier et former les cellules du revêtement osseux et les ostéocytes (Flores-Silva et al., 2015). L'ensemble de ces cellules constitue l'unité multicellulaire osseuse (BMU), qui coordonne l'alternance entre les phases de résorption (dégradation) et de formation osseuse, aussi définie comme le remodelage osseux. Lors de conditions homéostatiques, ce processus contribue à maintenir nos os en bonne santé en assurant leur intégrité et leur adaptation à l'environnement comme lors de la croissance ou lors de la réparation de fractures ou lésions (Peruzzi et al., 2011). Néanmoins, sous certaines conditions, un déséquilibre du remodelage osseux peut avoir lieu et ainsi favoriser la formation excessive des os par les OSBs, ou la résorption osseuse par les OSCLs. Un excès de masse osseuse est nommé ostéopétrose et une perte et fragilisation des tissus osseux nommée ostéoporose (Rachner et al., 2011 ; Sobacchi et al., 2013). Actuellement, l'ostéoporose est une pathologie qui touche environ 200 millions de personnes à travers le monde (Sözen et al., 2017).

Dans ce contexte, plusieurs études ont constaté un débalancement du remodelage osseux en faveur de la résorption lors d'hémolyses aiguës ou chroniques (drépanocytose, thalassémie, malaria), où on retrouve une forte lyse des globules rouges (GRs) et une forte libération d'hémoglobine (Baldenzi et al., 2011 ; Moreau et al., 2012 ; Smith-Guzmán, 2015 et Taher et Saliba, 2017). Chez l'Homme, il a été suggéré que l'hyperplasie de la moelle osseuse, causée par une érythropoïèse exacerbée en raison de la perte d'érythrocytes causée par l'hémolyse, est un des acteurs responsables de l'ostéoporose chez les personnes affectées (Gurevitch et Slavin, 2006 ; Steer et al., 2016). Néanmoins, chez les souris soumises à un stress hémolytique, cette perte osseuse est également retrouvée, malgré le fait que la production de GRs en réponse au stress hémolytique murin a lieu dans la rate. Ceci suggère que l'augmentation du volume de la moelle osseuse n'est pas le seul élément pouvant altérer la masse osseuse. L'ostéoporose associée à la thalassémie (pathologie hémolytique d'origine génétique) est aussi caractérisée par une augmentation de la résorption osseuse par les OSCLs et une diminution de la formation osseuse par les OSBs (Voskaridou et Terpos, 2004 ; Pirivakuntorn et al., 2020).

Notre laboratoire a reporté une perte rapide de masse osseuse chez la souris à la suite d'une infection aiguë par *Plasmodium chabaudi adami* (parasite responsable de la malaria) ou d'une hémolyse aiguë causée par l'administration de phénylhydrazine (Moreau et al., 2012). Dans ces modèles d'hémolyse, une hausse d'hème (protoporphyrine IX Fe^{2+}) libre et une chute des marqueurs sériques de formation osseuse (ostéocalcine, OCN et propeptide N terminal du collagène de type I, PINP) sont mesurés. L'inhibition de la formation d'OSCLs a aussi été constatée, mais sans modifications majeures des marqueurs de résorptions osseux (telopectide N terminal du collagène de type I, CTX). Ces résultats suggèrent que la perte de masse osseuse observée chez les souris soumises à une hémolyse aiguë semble être consécutive à un déséquilibre du remodelage osseux, qui favorise la résorption osseuse. De plus, cette perte de masse osseuse a aussi été reproduite chez la souris, après l'injection d'hémine (HE, protoporphyrine IX Fe^{3+} , figure 1.1) (Scorza et al, article en préparation). Ces éléments laissent suggérer un effet de l'HE, accentuant la dégradation de la matrice osseuse par les OSCLs matures.

Ainsi, l'objectif ultime de notre recherche était de comparer l'action de l'HE chez les OSCLs en voie de différenciation et chez les OSCLs déjà préexistants (matures). Dans cette optique, nous avons généré des OSCLs matures à partir de précurseurs myéloïdes provenant de la moelle osseuse de souris BALB/c, pour ensuite les conditionner avec de l'HE, afin de suivre leur survie et leur capacité à dégrader une matrice minéralisée *in vitro* (la surface totale, la moyenne ainsi que la distribution des événements de résorption ont été considérées). Parallèlement, nous avons évalué l'influence de l'HE sur la migration cellulaire et sur l'adoption du phénotype sénescence chez les cellules RAW 264.7 (lignée de monocytes/macrophages), phénotype exprimé lors de la formation d'OSCLs matures fonctionnels, qui est caractérisé par une forte activité métabolique, l'expression de la β -galactosidase, l'arrêt du cycle cellulaire et la production de protéases (cathépsine K et métalloprotéinases), protéines impliquées dans leur activité de résorption (Chen et al., 2007 ; Gorissen et al., 2019 ; Lee et al., 2021).

Nos résultats confirment les faits observés *in vivo* : l'HE cause une baisse de l'ostéoclastogénèse mais n'inhibe pas la dégradation de la matrice minéralisée chez les OSCLs matures ; de plus, en sa présence, la survie des OSCLs matures est favorisée. Enfin, nos résultats chez la lignée cellulaire RAW 264.7 démontrent que la présence d'HE accentue la sénescence cellulaire mais n'affecte pas significativement la migration.

CHAPITRE 1

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Le remodelage osseux

En conditions homéostatiques, le remodelage osseux est un processus qui assure l'intégrité et l'adaptation des os à leur environnement comme lors de la croissance ou la réparation de fractures ou lésions (Peruzzi et al., 2011).

Ce processus se déroule en trois phases : 1) la dégradation de la matrice osseuse par les OSCLs, 2) l'arrêt de la résorption de l'os et l'arrivée sur la zone cible des OSBs (étape transitoire) et 3) la formation d'une nouvelle matrice par les OSBs. En moyenne, la durée de vie d'un OSCL est de 12-15 jours et celle des OSBs est de 100 jours (Rosenberg et al., 2012). Les ostéocytes et les cellules du revêtement osseux sont d'autres cellules impliquées qui produisent des molécules favorisant ou non la résorption et/ou la formation de l'os. L'ensemble de ces cellules (OSCLs/OSBs/ostéocytes et cellules du revêtement osseux) constituent la BMU (Florencio-Silva et al., 2015).

Les os sont composés principalement d'une couche minérale constituée d'hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) et d'une couche organique, constituée majoritairement de collagène de type I (90%), de protéines non collagéniques (NCPs), de petits protéoglycanes riches en leucine (*small leucine-rich proteoglycans*, SLRP), de protéines acides g- carboxyglutamique (*g-carboxyglutamic acid protein*, GLA), de petites protéines sécrétées riches en cystéine (*small secreted cysteine-rich proteins*, CCN), de lipides (2%) et d'eau. Ces éléments vont permettre une élasticité tissulaire, la stabilisation du dépôt initial de la matrice minéralisée et la fixation de macromolécules. De plus, lors de la formation de la matrice minéralisée par les OSBs, de nombreuses molécules et facteurs de croissance y sont intégrés, tels que le facteur de croissance endothéliale vasculaire (*vascular endothelial growth factor*, VEGF), le facteur de croissance des fibroblastes (*fibroblast growth factor*, FGF), le facteur de croissance de l'insuline (*insulin growth factor 1*, IGF-1) et le facteur de croissance transformant bêta 1 TGF- β 1 (*transformant Bêta 1 growth factor*, TGF- β 1) (Boskey et al., 2013).

Les os constituent ainsi une grande réserve de minéraux (calcium, magnésium, phosphate) et de macromolécules (VEGF, FGF, IGF, TGF- β) qui sont libérés lors de la résorption de la matrice osseuse, et

contribuent à de nombreux procédés à l'échelle cellulaire et moléculaire au sein de notre organisme. Concrètement, le phosphate est utilisé lors de la synthèse des nucléotides et pour les événements de phosphorylation. Le calcium et le magnésium sont utilisés comme cofacteurs par de nombreuses enzymes impliquées dans diverses voies de signalisation. Tandis que les facteurs de croissance stimulent la réparation du tissu osseux (Van Niekerk et al., 2018) ou peuvent au contraire favoriser la résorption de l'os, en agissant sur les principaux acteurs de ce processus, les OSCLs et les OSBs (Boyce et al., 2013). Ainsi un os en bonne santé résulte d'un bon équilibre entre les phases de résorption et de formation osseuse, se traduisant par une bonne microarchitecture, une densité optimale et une bonne répartition protéique au sein de la matrice organique (Boskey et al., 2013). L'ensemble de ces paramètres peuvent varier avec l'âge, l'environnement ainsi que la présence de maladies génétiques ou pathologies telles que la drépanocytose, la malaria et la thalassémie.

1.2 Les ostéoclastes

1.2.1 Origine des ostéoclastes

Les OSCLs sont originaires des cellules souches mononucléées hématopoïétiques (CSHs), hébergées dans la moelle osseuse. Leur formation requiert l'engagement dans la voie myéloïde, la différenciation, la multinucléation et l'adoption d'un phénotype d'OSCL mature (Peruzzi et al., 2011) (Figure 1.1). Les premières étapes dans l'ostéoclastogénèse impliquent l'action de trois facteurs de transcriptions chez les cellules souches : i) PU.1, ii) le facteur de transcription associé à la microphthalmie (Mitf) et iii) le facteur de transcription inducteur IGHM 3 (Tfe3). Ces derniers induisent l'expression du gène *c-fms*, qui code pour le récepteur du M-CSF (facteur stimulant la colonie des macrophages) (M-CSFr), et permettent la différenciation des cellules souches en monocytes (précurseurs des macrophages).

1.2.2 Formation des ostéoclastes

Le M-CSF produit par les cellules mésenchymateuses ostéoprogénitrices et les OSBs se lie aux récepteurs cellulaires et permet la survie et la prolifération des précurseurs myéloïdes (Florencio-Silva et al., 2015). Ce facteur conduit aussi à l'expression de RANK (récepteur activateur du facteur nucléaire Nf-kB), un récepteur membre de la grande famille des facteurs de nécrose tumorale (*tumor necrosis factor*, TNF). Par la suite, le ligand de RANK (RANKL) sécrété majoritairement par les ostéocytes et OSBs (Renama et al.,

2016), se lie à RANK et active de nombreuses voies de signalisation impliquant la voie NF- κ B, la kinase N-terminale c-Jun/protéine activatrice-1 (*c-Jun N-terminal kinase, JNK/activator protein-1, AP1*), c-myc, la calcineurine/facteur nucléaire du lymphocyte T activé c1 (*calcineurine/nuclear factor of activated T cell c1, NFATc1*), le proto-oncogène SRC non-récepteur Tyrosine Kinase (*SRC Proto-oncogene, non receptor Tyrosine Kinase, Src*), la protéine kinase 6 à activation mitogène p38/ facteur de transcription associé à la microphthalmie (*p38 mitogen-activated protein kinase 6, MKK6/ transcription factor associated with microphthalmia, MITF*), Src et la voie des kinases régulées par signal extracellulaire (*Extracellular signal-regulated kinases, ERK*). L'activation de ces voies est déclenchée par la transduction du signal initiée via les facteurs d'activation des récepteurs du TNF (*TNF receptor-activating activating factors, TRAFs*), et notamment TRAF6 qui se fixe au récepteur RANK et recrute les protéines kinases, car le récepteur RANK ne possède pas d'activité kinase intrinsèque. L'ensemble de ces événements permettent la formation et la survie des OSCLs (Boyce et al., 2013), ainsi que l'expression des gènes directement impliqués dans la résorption osseuse comme la cathepsine K (CTK) ou la phosphatase acide tartrate résistant (TRAP5b), et des gènes impliqués dans l'adhésion et la motilité cellulaire comme ceux codants pour la VCAM-1 et la ICAM-1 (Renama et al., 2016).

La formation des OSCLs matures requiert des événements de fusion cellulaire. De nombreuses études ont rapporté que cette fusion a lieu entre des pré-OSCLs TRAP+ (cellules mononucléées TRAP+) provenant de la moelle osseuse avec des OSCLs multinucléés (Soe et al., 2020). Les précurseurs des OSCLs sont présents dans l'ensemble de la moelle osseuse. Soe et al., 2019 ont démontré qu'une partie d'entre eux sont TRAP+ et forment des groupes de 2 à 5 cellules à proximité des réseaux vascularisés entourés de collagènes au sein de la moelle osseuse, où le M-CSF et le RANKL sont présents en faible quantité. Cependant, aucun événement de fusion n'y a été observé, les OSCLs multinucléés sont uniquement retrouvés à la surface de la matrice osseuse, cela confirme que la fusion et la formation d'un OSCL multinucléé se produisent sur cette matrice.

Pour arriver à la surface de l'os, les pré-OSCLs sont guidés par les vaisseaux sanguins entourés de collagène, le collagène étant rapporté comme favorisant la migration et la motilité des OSCLs (Soe et al., 2020). Alternativement, des progéniteurs présents dans le sang (monocytes), sont attirés par la production de sphingosine-1-phosphate (S1P) (Ishii et al., 2009). Généralement, la S1P est produite par les érythrocytes, les cellules endothéliales et les macrophages (Thuy et al., 2014) ; dans la moelle osseuse, la S1P est principalement générée par les érythrocytes (Meshcheryakova et al., 2017).

D'autres molécules sont impliquées dans le recrutement des pré-OSCLs, comme le facteur 1 dérivé des cellules stromales (SDF-1), le VEGF, mais aussi le RANKL et le M-CSF (Al-Dujaili et al., 2011). Ainsi, arrivé à proximité de la matrice osseuse, chez l'Homme, 70% des événements de fusion vont avoir lieu entre un OSCL multinucléé (immobile) et un OSCL mononucléé (mobile), contre 90% chez le chien et la souris (Soe et al., 2020). Cette fusion est permise selon un principe d'hétérogénéité, où les cellules qui fusionnent doivent présenter des différences dans l'expression de diverses protéines, dont principalement : la protéine transmembranaire spécifique aux cellules dendritiques (DC-STAMP), le CD47, le facteur connexine 43 (Cx43) et la syncytine-1 (Hobolt-Pedersen et al., 2014). Ces protéines interviennent à différents moments lors de la fusion, le CD47 et le DC-STAMP sont impliqués dans les événements de fusions précoces (entre pré-OSCL et cellule multinucléée), tandis que la syncytine-1, participe à la fusion entre cellules multinucléées (Soe, 2020 ; Møller et al., 2016). Les pré-OSCLs provenant de la moelle osseuse vont fortement exprimer le CD47 et le DC-STAMP contrairement aux OSCLs multinucléés positionnés sur la matrice osseuse, cette différence d'expression va permettre leur fusion (Soe, 2020). La fusion est un processus essentiel permettant la production d'OSCLs multinucléés, assurant ainsi une résorption optimale de la matrice osseuse, l'activité de résorption étant plus importante chez les OSCLs multinucléés (Pipers et al., 1992).

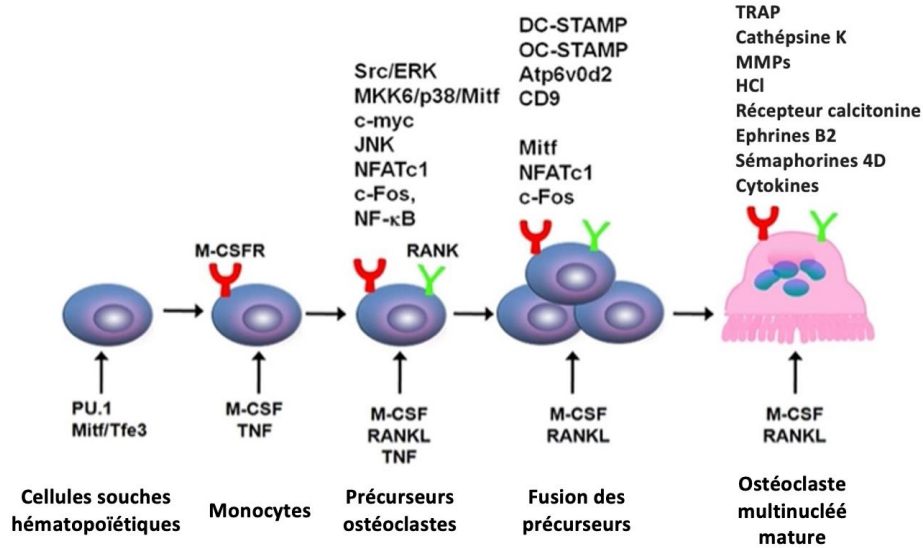


Figure 1.1 Éléments et facteurs clés impliqués dans la différenciation et la formation des OSCLs matures à partir des cellules souches hématopoïétiques.

Dans un premier temps, l'expression des facteurs PU.1, Mitf et Tfe3 induit l'expression du récepteur M-CSFr ; en présence de son ligand, le M-CSF, les cellules expriment le récepteur RANK, et deviennent des précurseurs des OSCLs (cellules CD11b+, M-CSFr+, RANKL+ : Stubelius et al., 2016). La liaison de RANKL sur son récepteur (RANK) induit de nombreuses voies de signalisations et active des facteurs de transcriptions clés dans l'établissement de l'ostéoclastogénèse, comme NF-κB, NFATc1, c-fos, Src, ERK, MKK6 et Mitf. Ces événements signalétiques conduisent à l'expression de protéines caractéristiques des OSCLs tels que TRAP, CTK et les MMP et permettent leur fonction physiologique de résorption osseuse. Figure modifiée tirée de : Boyce et al., 2013.

1.2.3 Mécanismes impliqués dans la résorption osseuse par les ostéoclastes

La stimulation des voies de signalisations par la liaison du M-CSF et du RANK sur leurs récepteurs respectifs conduit à l'expression de protéines clés, tels que Src et la protéine tyrosine kinase 2 (*Protein tyrosine kinase 2*, Pyk2), permettant de réguler le trafic vésiculaire, le remodelage du cytosquelette et le transport des ions au sein des OSCLs (Bruzaniti et Baron, 2006). Le remodelage du cytosquelette des OSCLs est un processus requis pour leur polarisation. Ainsi, après leur fixation sur la matrice osseuse par le récepteur d'intégrine vitronectine (αvβ3) (Boyce et al., 2013), quatre régions essentielles à l'activité de résorption des OSCLs sont distinguées :

1. La bordure froissée (*Ruffled border*, RB) qui constitue le pôle apical de la cellule, situé face à l'os permettant la libération d'enzymes (TRAP, CTK, Metalloprotéinase-9) et l'acidification par l'intermédiaire d'une pompe H⁺-ATPase de la zone de résorption (zone Howship), correspondant au lieu où l'OSCL va dégrader la matrice osseuse.
2. La zone d'étanchéité (*Sealing-zone*, SZ), lieu permettant la fixation des OSCLs sur la matrice. Cette région est étanche et délimite la zone de résorption (Zone Howship).
3. La région basolatérale, située aux extrémités de la cellule, contient des pompes Cl⁻/HCO₃⁻, permet l'entrée de chlorure dans la cellule et la libération d'ions chlorures dans la zone de résorption.
4. La région de sécrétion, située à l'opposé de la bordure frisée. Ce domaine contribue à la libération par transcytose de la matrice minéralisée et organique dégradée (Figure 1.2 (A)), amenant à la libération dans le milieu extracellulaire de minéraux (Ca²⁺, PO₄⁻, Mg²⁺) et facteurs de croissance (TGF-β, VEGF, FGF et IGF) (Florencio-Silva et al., 2015 ; Van Niekerk et al., 2018).

De manière générale, plusieurs étapes intra et extracellulaires interviennent dans la dissolution de la matrice minéralisée et organique. Le processus débute par l'action de l'anhydrase carbonique de type 2 (CA II), qui génère de l'acide carbonique à partir de CO₂ et d'eau (CO₂ + H₂O = H₂CO₃). Cet acide se dissocie ensuite et génère des ions bicarbonates (HCO₃⁻) et protons (H⁺), qui régulent le potentiel d'hydrogène (pH) dans la zone de résorption. Les protons (H⁺) sont ensuite transportés par une pompe vacuolaire H⁺-ATPase située sur la bordure froissée et acidifient ainsi la zone de résorption. Le pH, qui reflète la tendance acide ou basique de la zone de résorption, est ensuite contrôlé par une pompe chlorure/H⁺ anti-porteur 7 qui transporte des H⁺ en échange d'ions chlorure (pH<4). L'acidification permet ensuite la dissolution de la matrice minéralisée (hydroxyapatite), ce qui donne accès à la matrice et facilite sa dégradation par plusieurs enzymes sécrétées (CTK, TRAP et MMP-9) (Peruzzi et al., 2011). La dégradation de l'os fait donc intervenir l'acidification et la libération d'enzymes au sein de la zone de résorption (zone Howship) (Figure 1.2, B).

De plus, les OSCLs dégradent la matrice osseuse, d'une part de manière séquentielle, en se fixant sur la matrice, formant une fosse de résorption et se détachant pour résorber une autre zone (résorption

perpendiculaire à l'os), ou encore en restant fixés sur la matrice et la dégradant de manière continue formant ainsi des « tranchées » (résorption parallèle à l'os). Contrairement à la dégradation perpendiculaire de la matrice par un OSCL (qui forme une ou plusieurs fosses de résorptions), la dégradation verticale (tranchées) présente plusieurs avantages d'un point de vue de la résorption, d'une part, la vitesse de dégradation y est deux fois plus rapide soit $2,2\mu\text{m}/\text{heure}$ contre $0,8\mu\text{m}/\text{heure}$ et peut se poursuivre sur plusieurs jours, au moins 69h contre 13h pour une fosse de résorption « classique » (Soe et Delaissé., 2017). Le mode de dégradation en tranchées est plus important et implique 50% des OSCLs actifs, ce qui permet la dégradation d'une plus grande surface de l'os. Néanmoins, 80% de ces « tranchées » commencent par la réalisation d'une fosse de résorption (Soe et Delaissé., 2017).

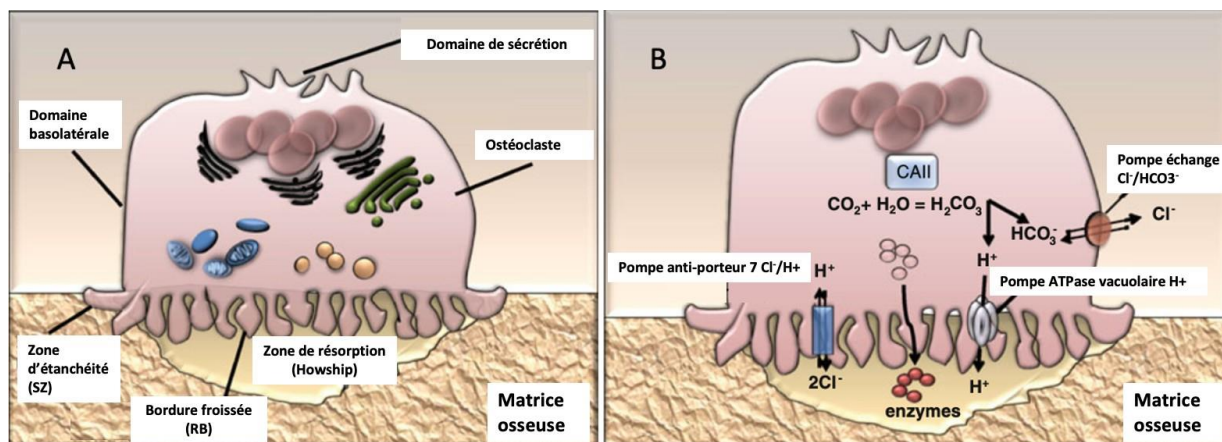


Figure 1.2 Morphologie (A) et mécanismes moléculaires (B) impliqués dans la résorption osseuse (Figure modifiée tirée de : Peruzzi et al., 2011).

Les domaines impliqués et leurs fonctions durant la résorption de la matrice osseuse par un OSCL mature multinucléé sont ici identifiés : les noyaux sont représentés en rose, le réticulum endoplasmique rugueux en noir, l'appareil de Golgi en vert, les mitochondries fournissant l'énergie nécessaire à la résorption (ATP) en bleu, et les lysosomes contenant les enzymes protéolytiques en jaune. (B) Implications des différents domaines dans la résorption de l'os et action de l'anhydrase carbonique de type 2 (CAII) et de la pompe d'échange $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ dans l'apport de protons (H^+) de manière ATP dépendante, permettant l'acidification de la zone de résorption et la dégradation de la matrice minéralisée. Les lysosomes y libèrent leurs enzymes protéolytiques (TRAP, MMP, CTK), qui sont activées à pH acide, et dégradent la matrice non minéralisée. Enfin, les produits issus de la dégradation de la matrice osseuse sont sécrétés dans l'environnement extracellulaire par le domaine de sécrétion de la cellule. Une fois la matrice entièrement dégradée par les OSCLs, les OSBs formeront une nouvelle matrice osseuse.

1.2.4 Rôle de la fission chez les ostéoclastes

Mc Donald et al., 2021 ont confirmé *in vivo* qu'en plus de pouvoir fusionner, les OSCLs ont la capacité de fissionner, autrement dit, les OSCLs multinucléés peuvent se séparer en plusieurs cellules sœurs, appelées « ostéomorphes ». (Car chez la plupart des cellules, la division cellulaire implique la réalisation d'un cycle cellulaire complet et permet de former deux cellules filles à partir d'une cellule mère ; tandis que chez les OSCLs, la division cellulaire est bloquée une fois différenciés). Les ostéomorphes sont ensuite capables de se fusionner avec un autre OSCL, contribuant ainsi à l'augmentation du nombre de noyaux, mais aussi de sa capacité de résorption. Car Boissy et al., 2002 ont montré que plus un OSCL possède de noyaux, plus sa capacité de résorption est importante.

Mc Donald et al., 2021 ont également montré que ces ostéomorphes étaient plus mobiles, n'entraient pas en apoptose et contribuaient à reformer des OSCLs, aussi décrits comme un phénomène de recyclage (durant le temps d'observation de l'étude qui était de 136 heures). Autre point intéressant, l'inhibition de la voie RANKL-RANK par l'administration d'OPG (le récepteur leurre de RANKL) réduit fortement ce processus de recyclage, car les ostéomorphes ne peuvent plus fusionner avec d'autres cellules ; néanmoins, l'accumulation d'ostéomorphes est constatée, ce qui suggère que la fission ne requiert pas forcément l'activation par RANKL, mais en sa présence, les ostéomorphes sont plus mobiles. Enfin, Mc Donald et al., 2021 ont aussi démontré que les ostéomorphes possèdent quelques similarités avec les OSCLs et macrophages, mais ont un transcriptome différent. Ainsi, cette récente découverte met en lumière un nouvel aspect concernant le fonctionnement et la régulation des OSCLs.

1.3 Les ostéoblastes

1.3.1 Origine et rôle des ostéoblastes

Les OSBs sont issus de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (CSMs). Ces cellules représentent entre 4 et 6% de la population cellulaire localisée sur la matrice osseuse (Flores-Silva et al., 2015). Les CSMs conduisent à la formation de quatre types cellulaires distincts : les chondrocytes, les myoblastes, les adipocytes et les OSBs. L'engagement dans la voie ostéoblastique nécessite l'expression de divers facteurs de transcriptions (Rutkovskiy et al., 2016). Ainsi, la première étape dans ce processus est l'expression du facteur de transcription 9 SRY-Box (*SRY-Box Transcription factor 9*, SOX9) permettant l'engagement des cellules ostéoprogénitrices dans la voie des chondrocytes (cellules du cartilage). Ensuite il y a l'expression du facteur de transcription 2 de la famille RUNX (*RUNX family transcription factor 2*,

RUNX2), qui permet l'initiation de l'ostéoblastogénèse et la différenciation des CSMs en pré-OSBs (Komori, 2009). Par la suite, les cellules prolifèrent et expriment les gènes codant pour la fibronectine, le collagène, le récepteur au TGF- β 1, l'ostéopontine (Rutkovskiy et al., 2016), ainsi que la phosphatase alcaline (Florencio-Silva et al., 2015). La progression à travers la lignée ostéoblastique se poursuit en présence de plusieurs facteurs, dont le TGF- β 1, la protéine morphogénétique osseuse (BMP), la vitamine D et des glucocorticoïdes (Rutkovskiy et al., 2016). Les OSBs sont considérés matures du fait de leur polarisation (adoption d'une morphologie cubique), de l'augmentation de l'expression d'ostéorix (Osx) induite par la voie de signalisation Wnt- β caténine (WNT- β -catenin), son activation a lieu après fixation de protéines Wnt, ce qui entraîne l'accumulation intracellulaire de β -caténine, et ainsi, la translocation de cette protéine dans le noyau et l'activation de facteurs de transcriptions induisant l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et maturation des OSBs (Houschyar et al., 2019 ; Salhotra et al., 2020). Mais aussi par leur interaction avec les protéines présentes sur la matrice osseuse, comme les intégrines, ostéopontines, fibronectines, sialoprotéines et le collagène (Florencio-Silva et al., 2015). Une fois positionnées, ces cellules forment une nouvelle matrice osseuse sur la zone précédemment dégradée par les OSCLs. La fabrication de cette matrice *de novo* se produit en deux étapes ; dans un premier temps, les OSBs génèrent l'ostéoïde, correspondant à la sécrétion des protéines de collagène, principalement du collagène de type I, des protéines non collagéniques (OCN, ostéonectine, sialoprotéine osseuse (BSP II) et ostéopontine) et des protéoglycanes dont la décorine et le biglycane. Dans un second temps, les OSBs libèrent des vésicules nommées « vésicules matricielles » ces dernières vont accumuler les ions présents dans l'espace extracellulaire, ce qui va conduire à leur rupture et à la libération des minéraux sur la matrice organique (ostéoïde). Ces derniers cristallisent (phénomène de nucléation) et constituent une nouvelle matrice minéralisée (Blank et Sims, 2019).

Sur l'ensemble des OSBs impliqués dans la formation osseuse, certains rentrent en apoptose (environ 50-70% d'entre eux) lorsque la matrice est formée, ou encore se différencient en deux autres types cellulaires, à savoir les cellules du revêtement osseux (OSBs en quiescence) et les ostéocytes (OSBs incorporés au sein même de la matrice osseuse) (Katsimbri, 2017).

1.3.2 Formation et rôle des cellules du revêtement osseux.

À la suite de l'entrée des OSBs dans un état de repos cellulaire (quiescence), les OSBs perdent leur morphologie cubique et adoptent une morphologie longue, mince et plate pour ainsi occuper la surface osseuse. Leur différence est aussi présente d'un point de vue phénotypique, car contrairement aux OSBs,

les cellules du revêtement osseux expriment la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM1), mais n'expriment plus l'OCN (Brown, 2013). Il a été démontré que la présence de ces cellules limite l'interaction physique entre les OSCLs et les OSBs avec la matrice osseuse, protégeant ainsi la zone osseuse sous-jacente. Cependant, ces cellules interviennent dans le remodelage osseux et méritent leur place dans la BMU, car comme les OSBs, elles produisent du RANKL et de l'ostéoprotégine (OPG) (Florencio-Silva et al., 2015). De plus, elles préparent la surface de l'os avant la résorption en éliminant les fibrilles de collagène non minéralisées grâce à l'action de métalloprotéinases, mais aussi après le remodelage, en déposant une couche de collagène sur la surface osseuse (Brown, 2013). Everts et al., 2002, ont également souligné leur participation au sein même de la zone de résorption, où ces dernières permettraient l'élimination des fibrilles de collagène non dégradées par les OSCLs, permettant un nettoyage plus efficace avant la formation de la nouvelle matrice.

1.3.3 Formation et rôle des ostéocytes

Les ostéocytes sont formés lors de la production de la matrice osseuse, lors de ce processus l'ensemble des OSBs vont produire simultanément cette matrice (organique puis minérale) et une partie d'entre eux vont s'y retrouver incorporés et ainsi perdre près de 70 % de leurs organites et de leur cytoplasme, leur conférant une apparence en forme d'étoile, similaire à la morphologie des cellules dendritiques (Katsimbri, 2017). Ce changement morphologique est accompagné de la diminution d'expression de plusieurs facteurs ostéoblastiques tels que l'OCN, le BSP1, le collagène de type I et la phosphatase alcaline (ALP), et de l'augmentation de l'expression protéique de la matrice dentinaire 1 (DMP1) et de la sclérostine (marqueurs des ostéocytes). De plus, lors de leur intégration dans la matrice et leur transformation en ostéocytes, leurs prolongements membranaires (jusqu'à 50 par ostéocyte) vont parcourir l'ensemble de la matrice osseuse par l'intermédiaire de microvillosités appelées « canalicules » et ainsi former un vaste réseau de communication entre ostéocytes, OSBs et les cellules du revêtement osseux, nommé réseau « lacunocanaliculaire ». Ce réseau permet l'échange d'ions et de molécules de signalisations entre ces cellules, mais aussi l'apport d'oxygène et de nutriments en raison de sa proximité du système vasculaire. De plus, il participe dans la détection localisée des variations de pressions s'exerçant sur les os, capacité propre aux ostéocytes, qui convertissent un signal mécanique (pression) en un signal biochimique (effet piézoélectrique) (Florencio-Silva et al., 2015). Les ostéocytes représentent près de 90-95% des cellules totales présentes dans les os, et jouent un rôle très important dans le processus du remodelage osseux par le biais du réseau lacunocanaliculaire, mais aussi par la production de sclérostine, de la protéine 1 liée

à Dickkopf et de RANKL (Salhotra et al., 2020), favorisant ou non la phase de résorption et minéralisation osseuse (Renema et al., 2016).

1.4 Autres mécanismes de régulation du remodelage osseux

Le remodelage osseux implique l'ensemble des acteurs présents dans la BMU, à savoir, les OSCLs, et les OSBs formant par la suite les ostéocytes et les cellules du revêtement osseux (Salhotra et al., 2020). Nous avons vu que lors du remodelage osseux, les OSBs et les ostéocytes stimulent l'ostéoclastogénèse via la sécrétion de M-CSF et de RANKL (Florencio-Silva et al., 2015). Cependant, d'autres molécules sont produites et permettent la régulation de l'ostéoclastogénèse. C'est le cas de l'ostéoprotégine (OPG), protéine majoritairement produite par les OSBs et les lymphocytes B (Chen et al., 2017). Cette protéine agit comme récepteur leurre, en se liant au RANKL présent dans l'environnement et empêche ainsi l'activation de son récepteur RANK (Boyce et al., 2013). De la même manière, le récepteur 4 couplé aux protéines G contenant des répétitions riches en leucine (*leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 4*, LGR4) présente sur la membrane des OSCLs exerce un effet similaire et conduit à l'inactivation de la signalisation via RANK et ainsi du facteur de transcription clé NFATc1. De plus, l'expression de LGR4 est induite par l'activation de RANK, ce qui en fait une boucle de régulation négative (Luo et al., 2016). Ainsi, ces deux éléments permettent de réguler et de limiter l'activation des OSCLs.

Parallèlement, d'autres mécanismes prennent place pour limiter l'ostéoblastogénèse ; c'est le cas de la sécrétion de sclérostine et de la protéine 1 liée à Dickkopf par les ostéocytes (Moriishi et al., 2012), antagonistes de la voie de signalisation Wnt- β caténine (WNT- β catenin), une voie clé dans la différenciation ostéoblastique (Salhotra et al., 2020). De plus, l'expression d'autres molécules et récepteurs comme les sémaphorines et éphrines agissent en réduisant autant l'ostéoclastogénèse que l'ostéoblastogénèse (Chen et al., 2017).

1.5 Les conditions hémolytiques.

En condition homéostatique, les GRs circulent constamment à travers la rate au niveau de la pulpe rouge qui agit comme un filtre. Les GRs viables y passent en raison de leur flexibilité, mais ceux vieillissants perdent leur flexibilité membranaire et ainsi leur capacité à traverser ce filtre, et finissent par être éliminées de la circulation par les macrophages de la pulpe rouge de la rate. L'hémolyse correspond à la destruction ou à l'élimination précoce des GRs en circulation avant qu'ils n'atteignent leur espérance de

vie normale (120 jours). On distingue deux types d'hémolyse, l'hémolyse intravasculaire, correspondant à la lyse des GRs et à la libération de leur contenu dans le plasma sanguin, et l'hémolyse extravasculaire, où les GRs ayant des altérations membranaires sont phagocytés par les macrophages du foie et de la rate, évitant la libération directe de leur contenu dans le plasma (Dhaliwal et al., 2004). La lyse des GRs est compensée par une érythropoïèse accentuée dans la moelle osseuse chez l'humain, maintenant ainsi l'apport en oxygène. L'hémolyse des GRs peut être d'origine génétique ou causée par :

1) Des déficiences de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), conduisant à une baisse de la résistance des GRs au stress oxydatif, car la G6PD stimule la production de glutathion, molécule aux propriétés antioxydantes. Des anomalies membranaires (sphérocytose et elliptocytose héréditaires) causées par des mutations dans les gènes codant pour le cytosquelette et la membrane des GRs, induisant une détérioration progressive de cette dernière (Spsychalska, 2012).

2) Des hémoglobinopathies, qui regroupent la drépanocytose, mutation de la chaîne bêta de l'hémoglobine causant une déficience dans la flexibilité des GRs ou la thalassémie, causée par la synthèse des chaînes alpha ou bêta de l'hémoglobine qui sont déficiente, amenant à leur précipitation et à des altérations des membranes érythrocytaires (Dhaliwal et al., 2004).

3) L'hémolyse peut aussi être induite lors de pathologies comme le cancer (leucémies, lymphomes), à la suite d'infections bactériennes (*Mycoplasma pneumoniae*) ou virales (Epstein-Barr, virus de l'immunodéficience humaine), lors de traitements médicamenteux lourds (pénicilline), et lors de transfusions sanguines (incompatibilité entre GRs donneur et receveur) (Dhaliwal et al., 2004). Dans l'ensemble de ces conditions, des réactions auto-immunitaires contre les GRs ont lieu, dans lesquelles des anticorps (IgG et IgM) et/ou molécules du complément ciblent les érythrocytes et conduisent à leur phagocytose par les macrophages et dans certains cas, à leur lyse dans le plasma sanguin en raison de la formation du complexe d'attaque membranaire induit par les molécules du complément (Dhaliwal et al., 2004).

4) Enfin, la lyse des GRs peut être induite de manière chimique avec de la phénylhydrazine ou encore de manière infectieuse comme c'est le cas de la malaria (causée par le protozoaire *Plasmodium*) et de la babésiose (*Babesia sp*) ; ces parasites infectent et effectuent leur cycle de réplication au sein des GRs et produisent des toxines induisant leur lyse.

1.5.1 Structure et catabolisme de l'hème

De manière générale, les conditions hémolytiques sont associées à une lyse importante des GRs, et à la libération concomitante d'hémoglobine dans le plasma sanguin. L'hémoglobine se présente sous forme de tétramère, où deux chaînes alpha et bêta se font face ($\alpha_2\beta_2$).

Chaque chaîne est associée à un groupement prosthétique d'hème, ce dernier étant un atome de Fer (Fe^{2+}) entouré de quatre molécules de pyrroles constituant un anneau de protoporphyrine IX. Lors de sa libération dans le plasma sanguin, l'hémoglobine se sépare spontanément en deux dimères $\text{HbFe}^{2+}(\alpha\beta)$, puis la présence de ROS (espèces réactives de l'oxygène) et d'espèces réactives d'azote conduit à son oxydation en méthémoglobine ($\text{HbFe}^{3+}(\alpha\beta)$). En condition homéostatique, la méthémoglobine est prise en charge par l'enzyme antioxydante haptoglobine (Ferreira et al., 2008), produite majoritairement par les hépatocytes (cellules du foie) (Shih et al., 2014). Par la suite, le complexe haptoglobine-méthémoglobine est reconnu et internalisé par les monocytes et macrophages via le récepteur Hp (CD163) (Ferreira et al., 2008). Une fois internalisé, le complexe est ensuite pris en charge par l'hème-oxygénase (HO), une enzyme antioxydante (Ferreira et al., 2008) (Figure 1.3).

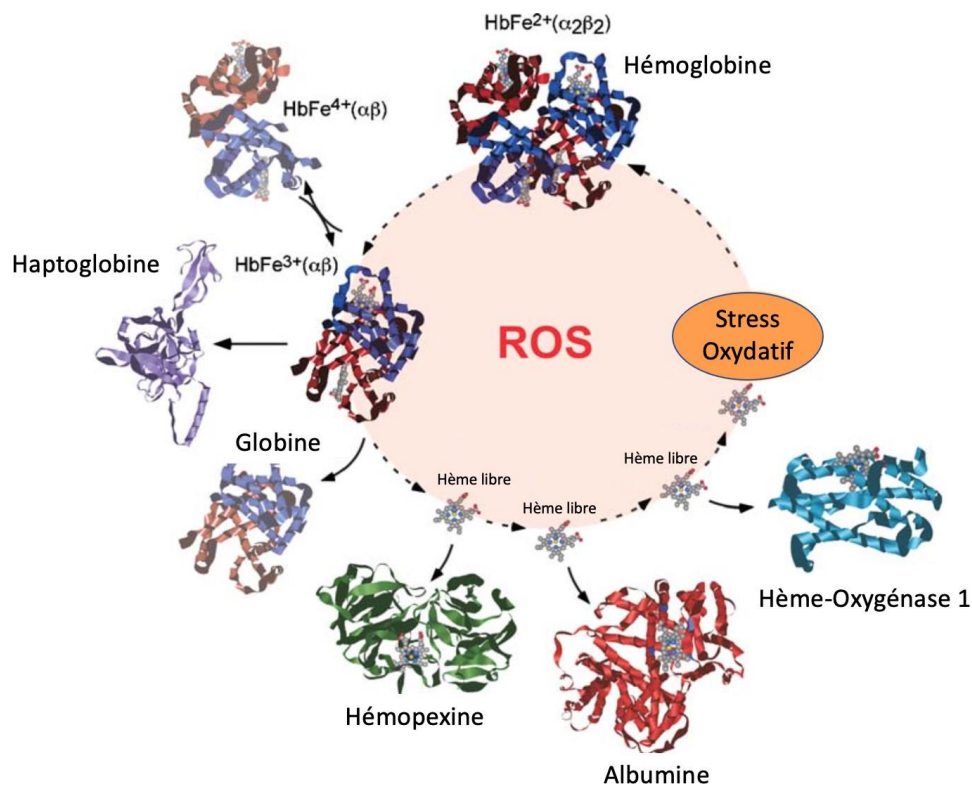


Figure 1.3 Mécanismes et enzymes impliquées dans le catabolisme de l'hémoglobine libérée dans le plasma sanguin.

(Légende figure 1.3) Lors de la lyse des GRs, l'hémoglobine sous forme de tétramères HbFe^{2+} ($\alpha_2\beta_2$) est libérée dans le plasma sanguin et forme spontanément un dimère HbFe^{2+} ($\alpha\beta$). Par la suite, sous l'action des ROS, l' HbFe^{2+} est oxydée en méthémoglobine (metHb, HbFe^{3+}), de plus, un intermédiaire connu pour ses actions pro-inflammatoires est généré l' HbFe^{4+} ($\alpha\beta$). En conditions homéostatiques, la méthémoglobine est prise en charge par l'haptoglobine (pas de libération d'hème), mais lors de l'hémolyse elle est saturée, ce qui conduit à une persistance d'hème libre. L'hème est donc prise en charge de manière extracellulaire par l'hémopexine et l'albumine puis dégradée de manière intracellulaire grâce à l'action de la HO-1. Figure modifiée et tirée de : Ferreira et al., 2008.

1.5.2 Le rôle de l'hème oxygénase

L'HO est une enzyme codée par le gène *Hmox1*, et existe sous trois isoformes (HO-1, HO-2 et HO-3) (Ferreira et al., 2008). La HO-1 est une forme inductible, fortement exprimée lors de conditions particulières, telle que la présence de son substrat l'hème (Figure 1.4), de chocs thermiques, de fer, de métaux lourds, d'un stress oxydatif, de cytokines inflammatoires, lors d'hypoxie ou en présence de lipopolysaccharides, molécule présente sur la surface des bactéries GRAM- (Wu et al., 2019). Une forme constitutive, la HO-2, est majoritairement exprimée dans le cerveau, et contribue à sa protection contre le stress oxydatif (Parfenova et Leffler, 2008). La HO-3 est une isoforme encore peu connue à ce jour, ayant une faible capacité de dégradation de l'hème libre (Wu et al., 2019). Ainsi, après avoir été prise en charge par l'haptoglobine et internalisée via le récepteur CD163, l'hème libre induit l'expression de la HO-1 et devient son substrat. L'HO-1 clive l'anneau de protoporphyrine IX de l'hème, libérant ainsi le fer en son centre, générant par la suite du monoxyde de carbone. La structure de protoporphyrine restante constituera la biliverdine (Figure 1.5), qui sera ensuite convertie en bilirubine par l'intermédiaire de la biliverdine réductase.

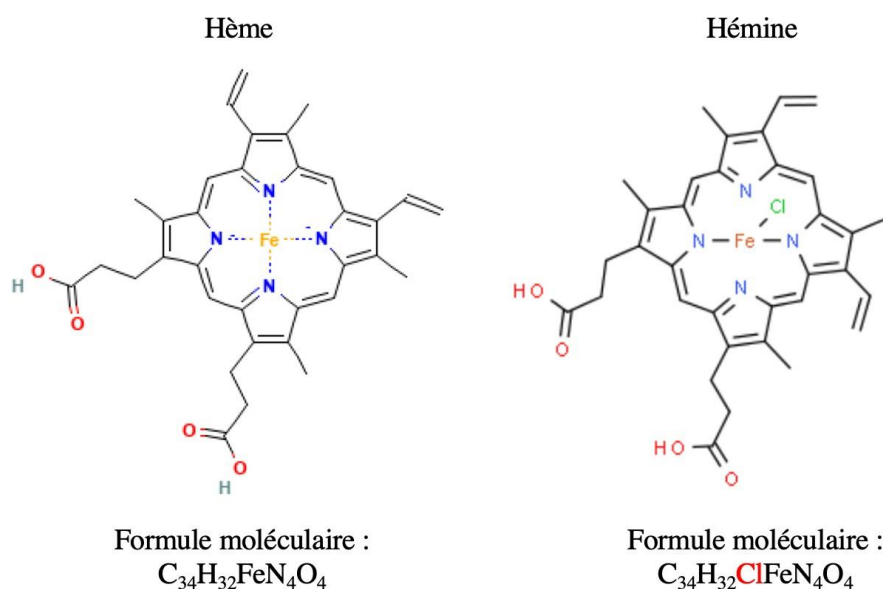


Figure 1.4 Structures et formules moléculaires de l'hème et de l'hémine (HE).

Les structures entre l'hème et l'hémine sont similaires, mais diffèrent au sein de la molécule, composée de fer pour l'hème et de fer et chlorure pour l'hémine.

Ainsi, le catabolisme de l'hème libre permet de générer des molécules aux propriétés antioxydantes (biliverdine, bilirubine et CO), mais aussi du Fe^{2+} , qui peut être à l'origine de la production de ROS, c'est pourquoi la ferritine possède un rôle important en stockant ce dernier et en l'oxydant, produisant du Fe^{3+} qui ne pourra plus servir pour la production de ROS. L'oxydation du fer est permise grâce à la ferroxidase de la sous-unité de la chaîne H de la ferritine (Ferreira et al., 2008). Le fer stocké, est ensuite utilisé pour d'autres processus physiologiques. Toutefois, lors d'une hémolyse importante comme c'est le cas pour certaines maladies (drépanocytose, malaria et thalassémie) l'ensemble de ces mécanismes sont saturés, ne permettant pas le catabolisme complet de l'hème libre en circulation, et conduisant à une perturbation de l'homéostasie cellulaire et à la dérégulation de plusieurs processus physiologiques tels que l'immunité innée et adaptative, ainsi que le remodelage osseux.

L'haptoglobine est présente à une concentration comprise entre 450 et 1650 mg/L dans le plasma sanguin, mais lors de conditions hémolytiques et plus particulièrement lors d'hémolyses intravasculaires, cette enzyme est saturée en raison de la présence accrue d'hémoglobine, car une grande majorité est internalisée et dégradée via le récepteur CD163 des macrophages et monocytes, causant une baisse de sa concentration dans le plasma sanguin (concentration < 450mg/L marqueur témoignant d'une hémolyse) (Naryzny et al., 2021). Dans ces conditions, la méthémoglobine n'étant pas prise en charge, il n'y aura pas d'internalisation du complexe haptoglobine-méthémoglobine et l'hème va être libérée dans l'espace

extracellulaire. D'autres enzymes peuvent alors intervenir comme l'albumine ou l'hémopexine en liant l'hème afin de limiter son action. Néanmoins, lors d'un stress hémolytique important, tous ces mécanismes sont saturés, la dégradation de l'hème libre n'est alors plus suffisante pour protéger l'homéostasie cellulaire, et de nombreux effets néfastes peuvent alors être provoqués (Ferreira et al., 2008 ; Nielson et al., 2010).

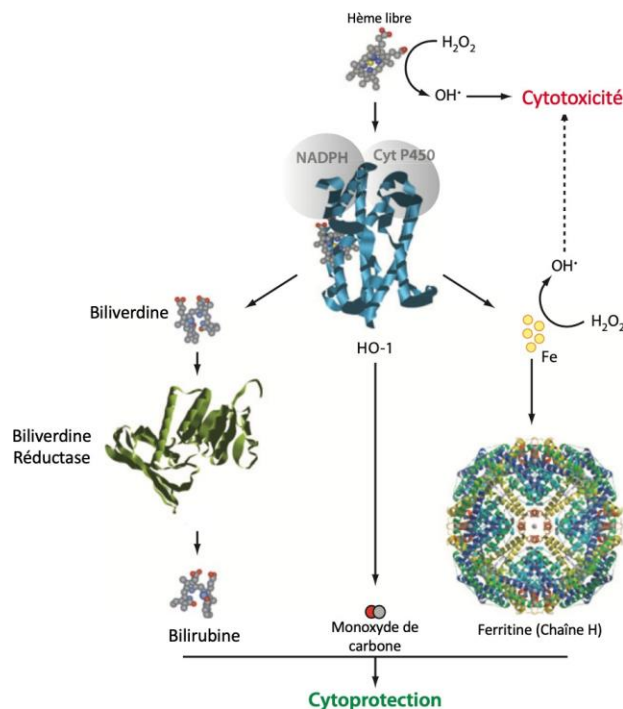


Figure 1.5 Mécanismes cataboliques de l'hème libre par la HO-1.

Cette enzyme génère trois éléments lors de la dégradation de l'hème libre : le monoxyde de carbone (CO), du Fer (Fe) et de la biliverdine (BV). La biliverdine est prise en charge par une autre enzyme la biliverdine réductase (BVR) formant une molécule aux propriétés antioxydantes, la bilirubine. Le fer est stocké dans la ferritine (chaîne H, FtH). Lors d'une hémolyse importante, la surcharge des mécanismes antioxydants induit la production de ROS à partir de l'hème libre et/ou du fer produit par la HO-1 via la réaction de Fenton. Figure modifiée tirée de : Gozzelino et al., 2010.

1.5.3 Effets délétères de l'hème libre

La méthémoglobine non prise en charge est oxydée et libère ses groupements prosthétiques (hèmes) dans le milieu extracellulaire, or l'hème libre peut avoir de lourdes conséquences sur l'organisme, comme la génération de ROS (peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , anion superoxyde O_2^- et le radical hydroxyle $HO\bullet$) par la réaction de Fenton ($Fe^{2+}(aq) + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+}(aq) + OH^-(aq) + HO\bullet$). La génération de ROS est responsable

de nombreux effets néfastes au sein de notre organisme, tel que des dommages sur l'ADN et l'ARN, l'altération de structures membranaires (diminution, intégrité et fluidité) ou encore l'oxydation d'acides aminés, le clivage des liaisons peptidiques et l'agrégation de protéines, conduisant à une perte des fonctions associées (Juan et al., 2021). De plus, par sa nature lipophile, l'hème diffuse à travers la membrane et peut directement s'insérer au sein de la bicouche phospholipidique, ce qui provoque l'oxydation de la membrane cellulaire et accentue la perméabilité membranaire, favorisant ainsi la lyse et la mort cellulaire (Chiabrando et al., 2014).

1.6 La dérégulation du remodelage osseux :

1.6.1 Lors du vieillissement cellulaire

1.6.1.1 La sénescence

Lors d'un stress oxydatif important, les ROS induisent la sénescence cellulaire (Pignollo et al., 2021), un état caractérisé par un arrêt du cycle cellulaire (provoqué par une hausse de l'expression des protéines p16, p21 et p53) et corrélé à une altération de l'expression génique, conduisant à l'adoption d'un phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP), qui correspond à la production de protéines pro-inflammatoires (IL-6, l'IL-8, l'IL-1 β , TNF- α), chimioattractantes des monocytes (MCP), inflammatoires des macrophages (MIP), chimiokines et molécules dégradant la matrice osseuse (métalloprotéinases, MMP). En outre, la sénescence est également caractérisée par une augmentation de l'expression de la β -galactosidase, qui est également connue sous le nom de SA-beta-gal (pour β -Galactosidase associée à la sénescence), ainsi que par des changements morphologiques et une résistance aux stimuli apoptotiques (Coppé et al., 2010 ; Salminen et al., 2011 ; Mijit et al., 2020 ; Elder et Emmerson, 2020 et Pingolo et al., 2021). L'ensemble de ces caractéristiques constituent des marqueurs qui permettent d'identifier la sénescence cellulaire.

L'entrée en sénescence des cellules peut être induite par le vieillissement cellulaire, car à chaque division mitotique, les télomères qui protègent l'extrémité de l'ADN des chromosomes raccourcissent, ce qui induit l'entrée en sénescence avec le temps, ou lors de stress comme des dommages à l'ADN, la présence de ROS (stress oxydatif), ou lors de l'oncogenèse (Farr et al., 2016 ; Pingolo et al., 2021). Néanmoins, l'entrée en sénescence présente des aspects bénéfiques comme favoriser la cicatrisation des plaies et limiter l'oncogenèse (car arrêt de la prolifération), mais aussi néfastes comme l'établissement d'un

environnement inflammatoire pouvant perturber l'homéostasie cellulaire, et qui paradoxalement peut conduire sur le long terme à une prolifération tumorale (Pingolo et al., 2021 ; Huang et al., 2022).

De plus, plusieurs stades de sénescence existent, comme la sénescence précoce, en développement et tardive, et à chaque type, des marqueurs précis sont exprimés, par exemple l'expression de p21 est précoce tandis que l'expression de la SA- β -galactosidase, tardive (Coppé et al., 2010 ; Pingolo et al., 2021).

Avec l'âge, une augmentation de la sénescence cellulaire des cellules impliquées dans le remodelage osseux comme les OSBs et les ostéocytes est constatée, avec une production accentuée des SASPs, conditions associées à une perte de la masse osseuse, perte rétablie après l'élimination des cellules sénescents (Kim et al., 2019 ; Farr et al., 2017). Dans ce contexte, des études considèrent la voie de signalisation NF- κ B, impliquée dans la formation des OSCLs en conditions homéostatiques, comme cruciale pour l'induction des SASPs et la réponse inflammatoire lors de la sénescence cellulaire (Salminen et al., 2011). Le stress oxydatif agit sur l'organisme de différentes manières et est responsable de nombreux effets délétères, d'où l'importance d'autres mécanismes de protection pour limiter ces effets. Parmi ces mécanismes, on retrouve notamment l'hémopexine, une protéine plasmatique qui lie l'hème libre en circulation et permet son internalisation par interaction avec le récepteur CD91, exprimé par les hépatocytes, macrophages, fibroblastes, adipocytes, neurones et trophoblastes. En deuxième, on retrouve l'albumine, protéine présente à une concentration de 44g/L dans le plasma et rapportée comme contribuant à la « séquestration » de l'hème libre en circulation (Pradhan et al., 2020 ; Ferreira et al., 2008).

1.6.1.2 Relation entre la sénescence et l'environnement osseux

Il est désormais établi que la proportion de cellules sénescents augmente avec l'âge, ce qui conduit à un environnement pro-inflammatoire à l'origine de la dérégulation de nombreux processus physiologiques (Farr et al., 2016 ; Pignollo et al., 2021). Concernant l'environnement osseux, le vieillissement cellulaire est associé à une perte de la masse osseuse plus importante en raison de la hausse de l'activité de résorption des OSCLs, corrélé à la diminution de la formation de matrice *de novo* par les OSBs (Khosla et al., 2018 ; Pignollo et al., 2021). Ainsi, la sénescence cellulaire semble plus affecter négativement les OSBs que les OSCLs.

Chez les OSCLs, il a été montré que la stimulation du récepteur RANK par RANKL induit la production de ROS (un des types de stress pouvant induire la sénescence), ce qui favorise l'ostéoclastogénèse.

Parallèlement, la présence de l'antioxydant n-acétyl-L-Cystéine (NAC) inhibe leur formation (Lee et al., 2005 ; Zhou et al., 2021).

Dans ce contexte, trois études indépendantes, Chen, W et al., 2007 ; Gorissen et al., 2019 et Lee et al., 2021 ont clairement démontré que les OSCLs adoptaient un profil de cellule sénescence lors de leur formation, en raison de la présence de nombreux marqueurs comme : l'arrêt prolifératif, leur morphologie, l'expression de la SA- β -galactosidase, l'expression de p21 et p16, la présence d'une forte activité métabolique ainsi que la sécrétion de protéases (CTK), métalloprotéinases et cytokines inflammatoires qui permettent de mener à bien leur activité de résorption. Chen et al., 2007 a également démontré un lien entre l'intensité de résorption (expression CTK), la viabilité des OSCLs et leur niveau de sénescence dans le cas d'une maladie génétique affectant les os (Pycnodysostose). Une forte expression de la CTK (forte résorption) est corrélée à une hausse de la sénescence, mais à une diminution de la viabilité cellulaire et inversement. De plus, cette équipe de recherche a utilisé une lignée cellulaire précurseur des OSCLs, similaire aux RAW 264.7 (les MOCP-5, qui en présence de RANKL peuvent former des OSCLs matures). Où ils ont démontré que lorsque l'expression de la CTK était accentuée chez les MOCP-5, une hausse de la sénescence était constatée et corrélée à une prolifération cellulaire diminuée. Ces études *in vivo* et *in vitro* confirment l'implication de la sénescence dans la néoformation des OSCLs et soulignent un potentiel effet régulateur de leur survie et de l'intensité de leur résorption.

1.6.2 Lors de conditions hémolytiques

Lors de conditions hémolytiques telles que celles liées à la thalassémie, la drépanocytose et la malaria, l'homéostasie osseuse est perturbée, entraînant une perte et une fragilisation des tissus osseux (ostéoporose) (Baldenzi et al., 2011 ; Moreau et al., 2012 ; Smith-Guzmán, 2015 ; Taher et Saliba, 2017). Les individus souffrant de thalassémie, une maladie caractérisée par la production d'hémoglobine défectueuse, font face à une surcharge de fer importante, causée par la lyse des GRs. Cela provoque des dysfonctionnements cellulaires, l'apoptose, et la nécrose des organes cibles en raison de l'accumulation de ROS (Taher et Saliba, 2017 ; Juan et al., 2021). Dans ce contexte, l'équipe de recherche de Jiang et al., 2022 a démontré que l'accumulation en fer conduit à une diminution des gènes impliqués dans la fonction et l'activité des OSBs, comme l'ALP, l'OPN, l'OCN et RUNX2 chez la lignée cellulaire MC3T3-E1 (précurseurs OSBs) ; cette diminution était corrélée à une réduction de la minéralisation *in vitro*.

Par ailleurs, d'autres effets néfastes ont été observés durant ces conditions, tels que la diminution de la viabilité cellulaire, la peroxydation des lipides, et la production excessive de ROS par la réaction de Fenton. Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs de la ferroptose (une forme de mort cellulaire nécrotique dépendante du fer), tels que la déféroxamine et la ferrostatine-1, a permis d'améliorer ces paramètres. Cette équipe a ensuite reproduit ces résultats *in vivo* chez des souris C57/BL6, montrant une diminution des marqueurs sériques de formation osseuse tels que l'OCN, l'OPN et la PINP. Cette diminution était associée à une réduction du volume osseux chez les souris C57/BL6, conduisant à une perte de masse osseuse. L'ajout d'inhibiteurs de la ferroptose a également permis de restaurer ces paramètres.

Parallèlement, plusieurs études ont confirmé et indiqué que la présence de fer réduisait l'expression du facteur de transcription RUNX2 et des gènes associés (OCN, ALP), diminuant ainsi la production d'une matrice minéralisée *de novo*. De plus, le fer sérique peut induire l'apoptose des OSBs en activant les caspases 3 et 7 (Shi et al., 2021). La présence de fortes concentrations ferriques est délétère pour la formation osseuse, néanmoins, cette dernière favoriserait la différenciation et l'activité des OSCLs (Jeney, 2017).

Cela s'explique d'une part par le fait que pour effectuer leur résorption, les OSCLs ont besoin d'une grande quantité d'énergie, obtenue majoritairement par un grand nombre de mitochondries. Or, la biogenèse mitochondriale nécessite du fer. De plus, la différenciation des OSCLs est associée à l'augmentation de l'absorption de fer par l'intermédiaire de la hausse d'expression du récepteur de la transferrine. Le fer permet également l'induction de ROS, nécessaires lors de l'ostéoclastogénèse. Enfin, la nécessité de cette molécule lors de l'ostéoclastogénèse s'est avérée lorsque sa chélation par la lactoferrine (protéine liant le fer) a inhibé la différenciation des OSCLs (Jeney, 2017 ; Ledesma-Colunga et al., 2021).

En résumé, ces études mettent en évidence que lors d'une hémolyse significative, l'équilibre du remodelage osseux est perturbé, favorisant la résorption osseuse au détriment de la formation de la matrice osseuse (Jeney, 2017 ; Shi et al., 2021 ; Jiang et al., 2022).

1.6.3 Hypothèse et objectifs

L'ostéoporose est une pathologie affectant une grande partie de la population mondiale, et particulièrement la population vieillissante. Néanmoins, il est désormais établi que les maladies hémolytiques sont aussi associées à cette pathologie. Dans ce contexte, l'équipe de recherche de Moreau et al., 2012 a pu constater une perte de masse osseuse chez des souris BALB/c ayant subi une hémolyse chimique (phénylhydrazine) et infectieuse (*Plasmodium chabaudi adami*) en raison de la diminution de la formation osseuse corrélée à la maintenance de la résorption osseuse. Cependant le fait que cette perte de masse osseuse se produise alors que moins d'OSCLs soit formés est intrigant. Notre projet vise donc à mieux comprendre ce phénomène en vérifiant et en étudiant le comportement des OSCLs matures et néoformés en présence d'HE *in vitro*.

Notre hypothèse de recherche est que la présence d'HE pourrait favoriser la persistance et/ou l'activité des OSCLs matures déjà différenciés sur la matrice osseuse, ce qui pourrait compenser la déficience de l'ostéoclastogénèse observée *in vivo*.

Pour répondre à cette hypothèse, nous avons défini 3 objectifs :

1. Confirmer l'effet inhibiteur de l'HE sur l'ostéoclastogénèse et la capacité de résorption des OSCLs néoformés.
2. Déterminer l'impact de la présence ou l'absence de M-CSF et de RANKL sur la persistance des OSCLs déjà différenciés et sur leur activité de résorption. Tout en y évaluant l'effet du conditionnement à l'HE.
3. Explorer l'effet de l'HE sur l'induction d'un profil de cellule sénescence et sur la capacité migratoire des RAW 264.7 (monocyte/macrophage (précurseurs OSCLs)).

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Modèle animal

Les souris BALB/c femelles de 6-8 semaines d'âge ont été obtenues chez Charles River Laboratories (Canada). Toutes les manipulations ont été approuvées par le Comité institutionnel de Protection des Animaux (CIPA) et suivent les recommandations du Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA) (protocole 989).

2.2 Culture cellulaire, génération et traitement des ostéoclastes *in vitro* (lignée cellulaire)

La lignée cellulaire de monocyte/macrophage murine RAW 264.7 provient de l'American Type Culture Collection (ATCC). Les cellules ont été cultivées dans du milieu Dulbecco's modification Eagle's medium (DMEM 1X avec 4,5g/L Glucose, et avec L-Glutamine et pyruvate de sodium) (Wisent #319-005-CL), supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et 1% de Pénicilline/Streptomycine. Pour le passage des RAW 264.7 un grattoir cellulaire a été utilisé. Pour induire la différenciation des RAW 264.7 en OSCLs, les cellules ont été re-suspendues dans du milieu α -MEM (Sigma #M6074), supplémenté avec 10% de SVF et 1% de Pénicilline/Streptomycine. Après adhérence ON (over night), les cellules ont été conditionnées avec 50 ng/mL de RANKL (PeproTech). La stimulation des RAW 264.7 a été réalisée après une nuit d'adhérence cellulaire selon les conditions testées : 5,75, 11,5 et 23 μ M d'HE. La culture cellulaire a été maintenue 6 jours, avec changement du milieu au jour 3.

2.3 Culture cellulaire, génération et traitement des macrophages et ostéoclastes *in vitro* (cellules primaires, souris BALB/c femelle)

2.3.1 Différenciation ostéoclastique

Afin d'obtenir des OSCLs, la moelle osseuse des os longs (fémurs et tibias) des souris BALB/c a été extraite par la technique de « rinçage », qui consiste à introduire du PBS à l'aide d'une seringue et d'une aiguille de 23G au sein des os préalablement coupés aux extrémités. Après récupération de la moelle osseuse, les cellules ont été mises en culture 18 heures dans du milieu α -MEM (Alpha Modification of Eagle's Medium) (α MEM 1X, avec L-glutamine (ThermoFisher #12571-063), supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 1% de Pénicilline/Streptomycine et 10% d'exsudat de la lignée fibroblastique murine L929 (SL929) comme

source de M-CSF. Les cellules non adhérentes ont été récupérées et mises en culture durant 6 jours dans du α MEMc + 25% SL929 en présence de RANKL (50ng/mL), et de 50 μ M de β -mercaptoéthanol afin d'obtenir des OSCLs multinucléés fonctionnels. Dans le cadre des manipulations, la génération des OSCLs matures multinucléés a permis de tester deux paramètres :

- 1) L'effet de l'HE sur la différenciation de précurseurs myéloïdes en OSCLs (ostéoclastogénèse), où les cellules ont été conditionnées ou non avec de l'HE à des concentrations de 5,75, 11,5 ou 23 μ M du jour 0 + 18h (adhérence cellulaire) au jour 6, avec un changement des milieux trois jours plus tard.
- 2) L'effet de l'HE sur les OSCLs matures déjà formés, où les cellules ont été conditionnées avec différents milieux du jour 6 au jour 12, à savoir α MEMc seul ou supplémenté avec 25% SL929, 50ng/mL RANKL, 25% SL929 et 50ng/mL RANKL, avec ou sans HE (11,5 et 23 μ M).

Les macrophages générés (utilisés comme contrôles) ont été stimulés avec 25% de SL929 du Jour 0 au jour 6, en présence ou non d'HE (5,75, 11,5 et 23 μ M) ou du Jour 0 au Jour 12 en présence ou non d'HE (11,5 et 23 μ M) avec un changement aux trois jours.

2.3.2 Production de macrophages

Un protocole de récupération des cellules non adhérentes de la moelle osseuse identique a été suivi, hormis le fait que les cellules ont été mises en culture dans du DMEMc supplémenté avec 15% de SL929 selon la méthode utilisée par Trouplin et al., 2013 durant 6 jours afin de générer des macrophages différenciés (changement milieu jour 3). Ce protocole a été vérifié par notre laboratoire et permet l'obtention d'une culture homogène de macrophages (100%) (données non présentées).

- Différenciation des macrophages en ostéoclastes.

Par la suite, du jour 6 au jour 12, les macrophages ont été conditionnés avec du α MEMc et 50 μ M de β -mercaptoéthanol avec 50ng/mL RANKL ou avec 25% SL929 + 50 ng/mL RANKL.

2.4 Stratégie d'identification des ostéoclastes

Lors du processus de différenciation des cellules myéloïdes, toutes les cellules non adhérentes ne se différencient pas en OSCLs, un marquage TRAP était nécessaire pour corroborer l'expression de cette enzyme (cellule rosée/violacée (TRAP5b+)) et ainsi déterminer si les cellules TRAP5b+ possédaient au moins 3 noyaux. Si ces deux paramètres étaient confirmés, la cellule était considérée comme un OSCL. À l'inverse des cellules mono et binucléées TRAP5b+ présentées dans la figure 3.1, positives pour le marquage TRAP, mais avec un nombre de noyaux inférieur à 3 qui ont été exclues (Figure 2.1).

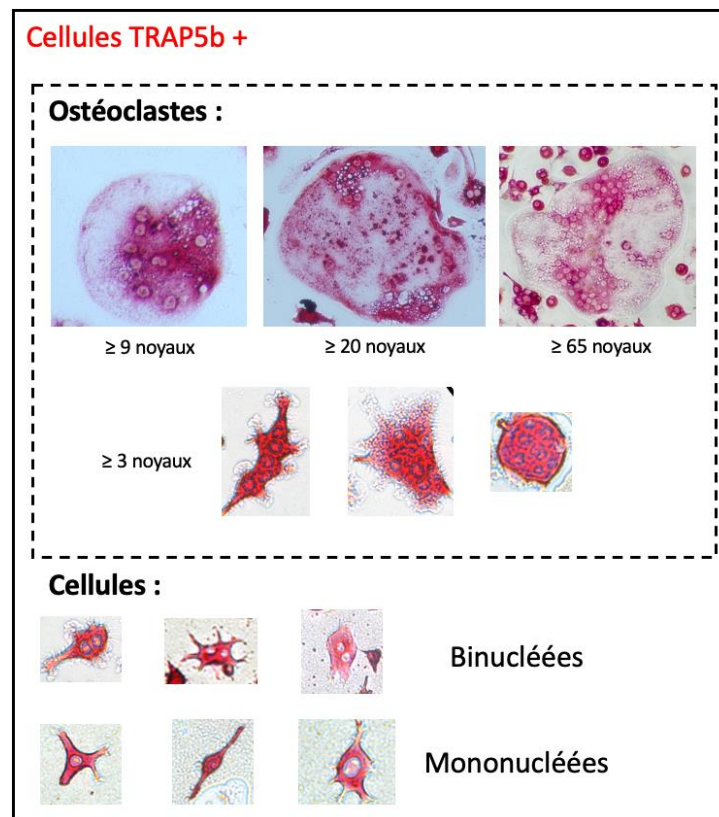


Figure 2.1 Stratégie d'identification des ostéoclastes.

Cette figure illustre la méthode utilisée pour discriminer les OSCLs. Sont présentées ici des cellules exprimant la TRAP (l'expression de cette enzyme donne une coloration rosée/violette chez les cellules positives), mais avec un nombre de noyaux variable (cellule mononucléée (1 noyau), binucléée (2 noyaux), ou OSCLs (≥ 3 noyaux)). La littérature considère un OSCL selon deux critères : sa positivité pour le marquage TRAP5b, et la présence d'au moins 3 noyaux (Ghayor et al., 2011 ; He et al., 2018 ; Zhang et al., 2022).

2.5 Production de M-CSF par la lignée fibroblastique L929

Afin d'obtenir du M-CSF, la lignée de fibroblastes L929 a été utilisée en raison de sa capacité à produire et sécréter cette protéine (Chakraborty et al., 2017 ; Guo et al., 2019 ; Frech, 2021 ; Heap et al., 2021). L'obtention du milieu conditionné par les cellules L929 en confluence a été réalisée selon les recommandations de Winston, (G.W et al., 2014). Brièvement, les cellules L929 ont été cultivées jusqu'à confluence dans une flask de culture T25, puis trypsinées et cultivées à une concentration de 1600 cellules / cm² dans une flask de culture T75. Après 7 jours de culture, le surnageant a été récupéré, filtré (22 µm), aliquoté et congelé à -20°C. Pour chaque manipulation, et changement de milieu, le milieu conditionné par les cellules L929 en confluence a été utilisé frais.

2.6 Préparation de l'HE

Avant de procéder au conditionnement des cellules, l'HE a été préparée de manière fraîche avant chaque expérience et chaque changement de milieu. Brièvement, l'HE sous forme de poudre (#H9039, Sigma, stockée à 4°C) a été resolubilisée dans du NaOH 0.2M stérile à une concentration de 1mg/mL. Par la suite, le pH a été ajusté à 7.4 par ajout de HCL 1M stérile. Les concentrations utilisées pour l'ensemble des manipulations : 5,75, 11,5 et 23 µM sont représentatives des concentrations retrouvées lors d'une hémolyse infectieuse (malaria) ≈ 25 µM ; chimique (phenylhydrazine) ≈ 19 µM, (Moreau et al., 2012) et génétique (drépanocytose) ≈ 27 µM (Gouveia et al., 2017).

2.7 Marquage phosphatase acide tartrate-résistante (TRAP)

Afin d'évaluer si les OSCLs exprimaient la phosphatase acide tartrate-résistante, un marquage TRAP a été réalisé selon les instructions du fabricant (Cosmo Bio Co #AK04F). En résumé, le surnageant cellulaire a été enlevé, les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS 1X, puis fixées durant 15 minutes avec de la paraformaldéhyde 4%. Après 3 lavages avec de l'eau distillée (dH₂O), la solution de marquage a été ajoutée. La réaction a eu lieu entre 10 et 20 minutes à 37°C, puis arrêtée avec un lavage à l'eau distillée. Les cellules positives pour ce marquage affichent une teinte rosée/rouge à l'inverse des cellules négatives restées incolores.

2.8 Marquage des cellules sénescences

L'entrée en sénescence des RAW 264.7 a été caractérisée par la présence de cellules positives à la β -Galactosidase nommé SA- β -Gal (β galactosidase associée à la sénescence). De plus, un inducteur connu de la sénescence, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) a été utilisé afin d'avoir un contrôle positif et une condition où la sénescence a été induite (Gary, R.K et Kindell, S.M (2005)). Pour quantifier l'expression de la SA- β -Gal, le surnageant de culture a été enlevé et les cellules ont été rincées avec du tampon phosphate salin (PBS) puis, fixées avec du paraformaldéhyde à 4% durant 15 minutes à RT. Les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS 1X (+ $MgCl_2$ 1mM, pH5) et incubées avec cette même solution ON à 37°C. Par la suite, la solution de marquage X-Gal a été ajoutée (Pour 10ml : 9,3mL PBS 1X/ $MgCl_2$ 1mM + 0,5mL KC 20X (0.82g $K_3Fe(CN)_6$ + 1.05g $K_4Fe(CN)_6$. $3H_2O$ + 25mL PBS 1X) + 0,25mL X-Gal 40X (40mg/mL solubilisé dans du N,N-diméthylformamide) et incubée à 37°C entre 3 et 10 heures à 37°C (environ 6-8 h pour les RAW264.7). Lorsqu'environ 20% des cellules du contrôle positif étaient positives pour le marquage, la solution de marquage X-Galactosidase a été enlevée et les cellules ont été lavées trois fois avec de l'eau distillée (dH_2O). Les plaques ont été stockées dans le noir à 4°C.

2.9 Analyse des transcrits par RT-PCR

Pour quantifier l'expression de gènes par qPCR, l'ARN total des cellules a été récupéré dans du TRIZOL (ThermoFischer) selon les instructions du fabricant et dosé au Nanodrop (ThermoFischer) afin de vérifier sa concentration et sa pureté. Par la suite, l'ARN a été converti en ADNc à l'aide du kit commercial high capacity cDNA (Applied biosystems) selon les instructions du fabricant, ayant comme programme 10 minutes à 25°C, 120 minutes à 37°C, 5 minutes à 85°C et stocké à 4°C. Finalement, la qPCR a été effectuée dans l'appareil ABI 7300 (Applied Biosystems) avec le Supermix SsoAdvanced SYBR green (BioRad). Le programme utilisé consiste en 30 secondes de dénaturation à 95°C suivie de 40 cycles de 15 secondes de dénaturation à 95°C et 60 secondes d'hybridation et extension à 60°C avec lecture de plaque. Une analyse de la courbe de fusion (melt-curve) a été effectuée à la fin des cycles. Les amorces ont été utilisées à une concentration de 150nM final (Voir Annexe A).

2.10 Migration cellulaire des RAW 264.7

Pour étudier l'effet de l'HE sur la migration cellulaire, la lignée murine de macrophages/monocytes, RAW 264.7 a été utilisée. Brièvement, $4,4 \times 10^4$ cellules/cm² ont été cultivées dans du milieu Dulbecco's

modification Eagle's medium (DMEM 1X avec 4,5g/L Glucose, et avec L-Glutamine et pyruvate de sodium) (Wisent #319-005-CL), supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et 1% de Pénicilline/Streptomycine. Après deux jours de culture et une confluence de 95%, un sillon a été réalisé avec un cône de P200 stérile afin de perturber la monocouche cellulaire. Après 2 lavages, les cellules ont été remises en culture durant 24 heures. La migration cellulaire dans la zone grattée a été photographiée toutes les 15 minutes et ce durant 24 heures à l'aide d'un microscope confocal (Chen et al., 2018 ; Sun, Lian et Meng (2019)). Les données ont ensuite été analysées grâce au logiciel NIS ELEMENTS.

2.11 Production de matrice minéralisée (Calcium-Phosphate)

Afin de quantifier l'activité de résorption des OSCs, une matrice minéralisée a été créée en suivant le protocole de Maria et al. 2013. Brièvement, une solution de Body fluid (SBF) a été préparée en mélangeant 50% de tampon Tris (50 mM Tris base, pH 7.4 ajusté avec 1M HCl), 25% d'une solution stock de calcium (25 mM $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.37M NaCl, 15 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dans Tris buffer, pH 7.4), et 25% de solution stock de phosphate (11.1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 42 mM NaHCO_3 dans du Tris buffer, pH 7.4).

Par la suite, une solution de phosphate de calcium a été préparée en ajoutant 41 mL HCl (1M) à 800 mL d'eau MilliQ (Soit 2,56 mL d'HCl (1M) pour 50 mL d'eau MilliQ). Ensuite, 2.25 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 4 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.14M NaCl, et 50 mM Tris y ont été dissous. Ces solutions ont été ramenées à pH de 7,4 et filtrées à travers un filtre de 0,22 μm . Des plaques de 96 puits ont été utilisées, et 200 μL de SBF ont été ajoutés dans chaque puits et incubés 3 jours à RT. La solution SBF a été aspirée et la solution CPS a été ajoutée (200 μL /puits) pendant 1 jour à RT, aspirée et 200 μL d'ETOH a été ajouté pour stériliser la plaque. Après évaporation sous hotte, les puits ont été nettoyés 2 fois avec de l'eau milliQ stérile. La plaque a été ensuite séchée à 37°C durant une nuit. Avant l'ajout des cellules, 100 μL de FBS ont été ajoutés 30 minutes à 37°C.

Les stocks déshydratés de Tris-Base ; Calcium ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), Magnésium ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), et de Chlorure de Sodium (NaCl) proviennent du fournisseur MilliporeSigma®. Les stocks déshydratés de Sodium phosphate dibasique ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) et de bicarbonate de sodium (NaHCO_3) proviennent de Anachemia®.

2.12 Marquage de la matrice

Dans le but de quantifier la dégradation de la matrice de calcium phosphate par les OSCLs, deux marqueurs distincts ont été utilisés.

Marquage colorimétrique avec le rouge d'alizarine ($C_{14}H_7NaO_7S$; Cat : A5533, Sigma). Avant l'application de ce marquage, les cellules ont été enlevées avec une solution de chlorure de sodium (1 M) dans 0,2% de Triton-X-100 (Maria et al., 2013). Puis, les puits ont été rincés avec de l'eau distillée (dH_2O) et la solution de rouge d'alizarine a été ajoutée (1mg/mL dans dH_2O) pendant 3-5 min. Ensuite, le colorant a été enlevé et la matrice a été observée au microscope. Les fosses de résorptions sont blanches et la matrice composée de calcium, rouge.

Marquage fluorescent avec de la calcéine ($C_{30}H_{26}N_2O_{13}$; Cat : C0875, Sigma). Ce marqueur a été appliqué directement sur la matrice avant la mise en culture des cellules à une concentration de 5 μM (dH_2O) durant 5 minutes. Après 3 lavages au dH_2O , les cellules ont été mises en culture selon le milieu et le conditionnement approprié. Le but était de pré marquer la matrice afin d'observer sa dégradation dans le temps en raison de la perte de fluorescence. Les fosses de résorptions sont noires et la matrice composée de calcium, verte.

2.13 Quantification et analyse de la résorption sur matrice de phosphate de calcium

Afin de quantifier l'activité de résorption des OSCLs, chaque puits a été photographié en entier par un microscope confocal, en utilisant le programme (« Large Image » ou « ND acquisition ») (Objectif 4X). Ensuite, chaque image a été traitée et analysée avec le logiciel NIS ELEMENTS. Brièvement, l'image a été rognée sous la forme d'un carré sans les bordures du puits afin d'éviter tout faux positif et d'affiner la détection des événements de résorptions. Par la suite, un seuil de détection a été défini (Binary>Define Treshold) afin que le logiciel repère toutes les fosses de résorptions (seuil de couleur défini sur blanc dans le cadre des matrices marquées avec le rouge d'alizarine (colorimétrique), contre un seuil de couleur noire pour les matrices marquées avec la calcéine (fluorescent)). Après la définition optimale du seuil, les événements inférieurs à 8 μm ont été enlevés pour éviter toute détection incorrecte. À cette étape, l'ensemble des fosses de résorptions sont détectées par le logiciel, il est donc nécessaire de convertir ces données en ROI (« Region of Interest », Région d'intérêt) (ROI>Move Binary to ROI) afin de les regrouper dans le fichier résultats du logiciel (événement par événement avec sa surface en μm^2) et de les exporter

sur le logiciel Excel afin de les analyser. Les figures 2.2 et 2.3 servent d'exemples visuels de la procédure utilisée, pour une matrice marquée au rouge d'alizarine, ou à la calcéine respectivement.

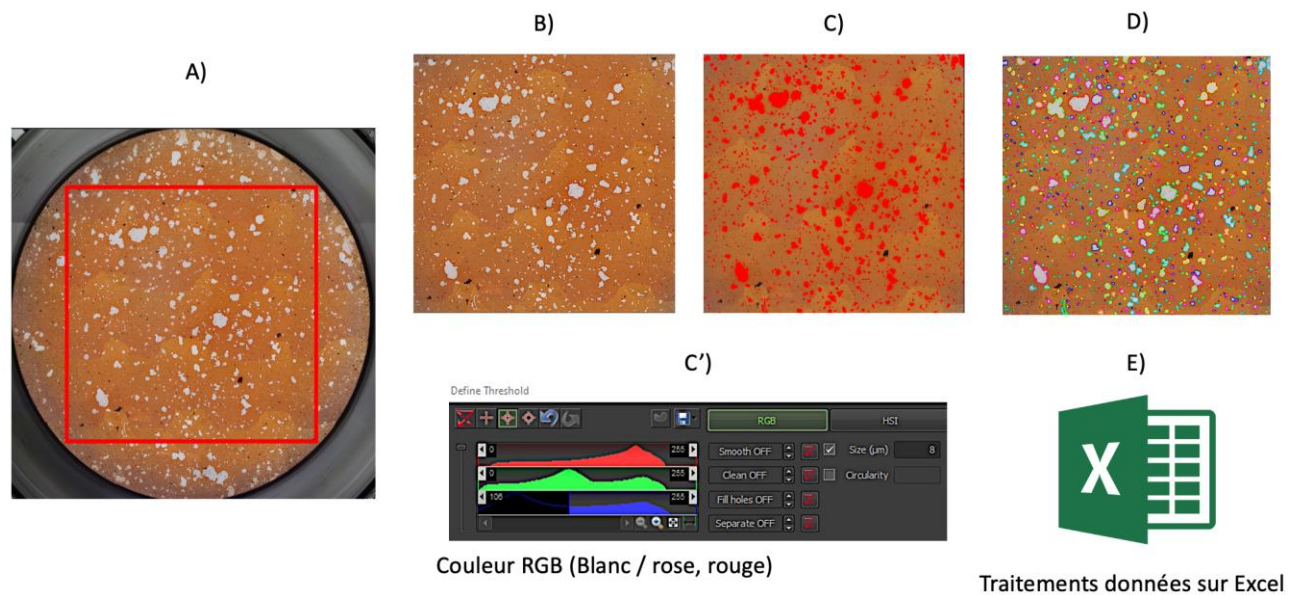


Figure 2.2 Méthode de quantification des matrices marquées avec le rouge d'alizarine

Après avoir été scannée au microscope confocal (4X) grâce à l'outil « Large Image » (A), l'image a été rognée au centre afin d'enlever les bordures du puits et de préserver une zone homogène pour l'étape de quantification (B). Par la suite, un seuil de référence RVB (Rouge Vert Bleu) a été défini sur la couleur des fosses de résorption blanches, une fois réglé le logiciel sélectionne en rouge l'ensemble des fosses de résorptions détectées (C et C'). A cette étape toutes les fosses de résorptions avec une surface inférieure à $8\mu\text{m}^2$ ont été exclues afin d'éviter tout faux positif qui pourrait altérer la qualité de la quantification (C'). Après vérification de l'absence de faux positifs et de zones saturées, la définition du seuil est validée et les données (binaires) sont converties en données d'intérêt (région d'intérêt, ROI) (D), puis exportées vers Excel pour finir de les traiter (détermination de la surface de résorption totale, de la surface moyenne des fosses de résorptions et de leur distribution) (E).

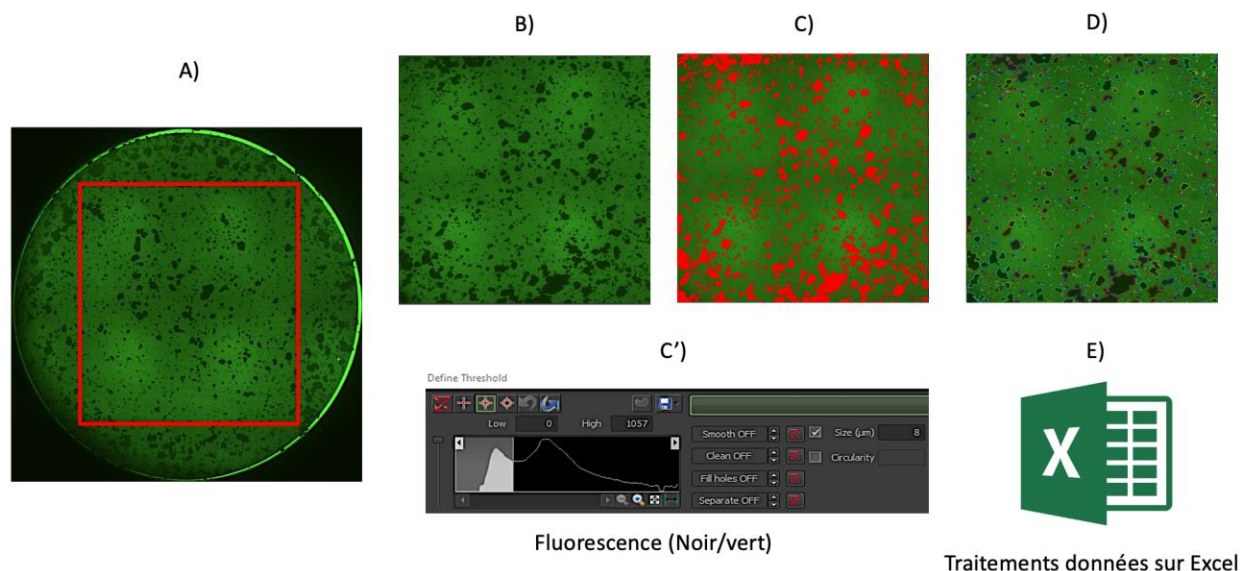


Figure 2.3 Méthode de quantification des matrices marquées avec la calcéine.

Après avoir été scannée au microscope confocal à fluorescence (4X) grâce à l'outil « Large Image » (A), l'image a été rognée au centre afin d'enlever les bordures du puits et de préserver une zone homogène pour l'étape de quantification (B). Par la suite, un seuil de référence monochrome a été défini sur la couleur des fosses de résorption noires, une fois réglé le logiciel sélectionne en rouge l'ensemble des fosses de résorptions détectées (C et C'). A cette étape toutes les fosses de résorptions avec une surface inférieure à $8\mu\text{m}^2$ ont été exclues afin d'éviter tout faux positif qui pourrait altérer la qualité de la quantification (C'). Après vérification de l'absence de faux positifs et de zones saturées, la définition du seuil est validée et les données (binaires) sont converties en données d'intérêt (région d'intérêt, ROI) (D), puis exportées vers Excel pour finir de les traiter (détermination de la surface de résorption totale, de la surface moyenne des fosses de résorptions et de leur distribution (E).

2.14 Analyse des données de résorptions par Excel

Une fois les données de résorptions extraites et recueillies sur Excel pour chaque puit, plusieurs analyses ont été réalisées. Dans un premier temps, pour l'ensemble des puits/conditions, la surface moyenne de résorption, la surface totale dégradée et le nombre total de fosses de résorptions ont été déterminés. La détermination de ces différents paramètres est importante car cela permet d'établir un profil de résorption. Cela donne une indication sur le comportement des OSLs en fonction des différents conditionnements, comme leur capacité à rester plus ou moins longtemps fixés sur la matrice, ce qui se traduirait par moins d'événements de résorption totale, mais une moyenne plus importante et inversement.

Ainsi, la capacité des OSLs à produire des fosses de résorption de différentes surfaces a été évaluée pour des surfaces comprises entre 10 et $50\mu\text{m}^2$ (10-50), comprises entre 50 et $100\mu\text{m}^2$ (50-100) et supérieures

à $500 \mu\text{m}^2$ (>500). Les formules Excel suivantes ont été utilisées, respectivement : « =SI(ET(K3 $\geq$ 10;K 3 $\leq$ 50);K3;) », « =SI(ET(K3 $\geq$ 50;K3 $\leq$ 1 00);K3;) » et « =SI(K3 $>$ 500;K3;) », avec K étant la plage de données ROI extraites de l'analyse faite via le logiciel NIS ELEMENTS (Chaque puits peut contenir entre plusieurs centaines voire plus milliers d'évènements).

2.15 Analyse statistique

Les données ont été présentées sous forme de moyenne $\pm$ SEM d'au moins trois répétitions biologiques. La signification statistique a été déterminée à l'aide d'un test Kruskal-Wallis et/ou d'un test non paramétrique Mann-Whitney. Tous les tests statistiques utilisés ont été indiqués dans les légendes des figures et ont été effectués à l'aide du logiciel Graphpad Prism version 5 (Graphpad Software), avec un seuil de confiance de 95%.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 L'HE inhibe la différenciation des précurseurs myéloïdes en ostéoclastes *in vitro*.

Nous avons d'abord confirmé les effets inhibiteurs de l'HE sur l'ostéoclastogénèse *in vitro*. Dans cette optique, les cellules non adhérentes de la moelle osseuse (contenant les progéniteurs et précurseurs des OSLs) ont été conditionnées avec du SL929 et du RANKL pendant 6 jours sans traitement ou en présence de différentes concentrations d'HE (5,75, 11,5 et 23 μM). La figure 3.1 (A) montre les cellules marquées pour la TRAP au jour 6 pour les différentes conditions et est représentative de la quantification illustrée en (B). En présence de SL929+RANKL, environ 40 OSLs ont été générés et ce nombre a diminué à la suite de l'augmentation de la concentration d'HE. Ces données ont confirmé une inhibition significative de l'ostéoclastogénèse par l'HE pour les concentrations de 11,5 (** $P<0,01$) et 23 μM (** $P<0,001$) (analyse statistique réalisée avec le test Kruskal-Wallis).

3.2 L'HE à 23 μM inhibe significativement la capacité de résorption des nouveaux ostéoclastes.

Dans le but d'évaluer l'effet de l'HE sur la résorption des OSLs néoformés (J0-J6), les cellules non adhérentes ont suivi le même schéma de différenciation et de traitement expérimental décrit en 3.1, mais ont été cultivées sur une matrice. Tel qu'attendu, il n'y a pas eu d'événements de résorption (matrice rosée/rouge) pour la condition avec des macrophages (contrôle négatif), à l'opposé de la condition SL929 + RANKL, où un certain nombre de fosses de résorptions ont été perçues (marques blanches) (Fig. 3.2, A).

En présence d'HE, à 5,75, 11,5 et 23 μM , la surface de résorption totale mesurée a diminué de manière dose-dépendante, l'inhibition étant plus significative avec l'HE à 23 μM (** $P<0,01$), soit une chute de 80% (500 000 à 100 000 μm^2) (Fig. 3.2, B). Concernant la surface moyenne de résorption, elle a été peu affectée par l'HE par rapport au contrôle, mais a été significativement diminuée pour la condition HE 23 μM en comparaison avec les deux autres conditions d'HE testées (Fig. 3.3, C).

Par la suite, nous avons étudié la tendance des OSLs à creuser des fosses de résorptions de différentes surfaces. L'ensemble des événements ont été classés selon 3 catégories : surfaces comprises entre 10 et 50, entre 50 et 500 ou supérieures à 500 μm^2 . Pour la condition contrôle (SL929 + RANKL), 20% des

événements de résorption représentaient soit une surface comprise entre 10 et 50 μm^2 , ou soit une surface supérieure à 500 μm^2 (ces deux intervalles de surface représentent donc 40% des événements), et la majorité des fosses de résorptions (60%) se situaient entre 50 et 500 μm^2 . Ce profil de distribution est resté similaire pour toutes les conditions avec l'HE (Fig. 3.2, D)

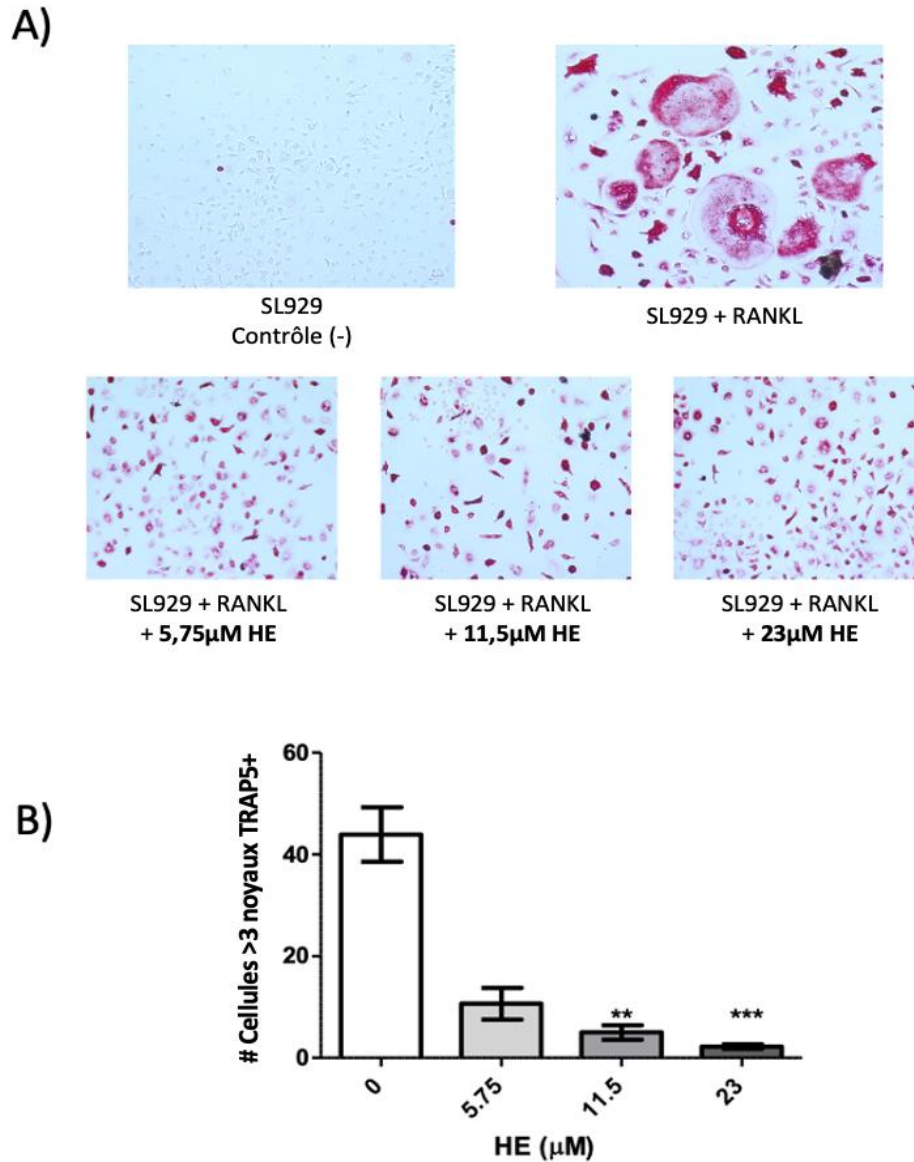


Figure 3.1 L'HE inhibe la différenciation de précurseurs myéloïdes en ostéoclastes *in vitro*.

Les cellules non adhérentes de la moelle osseuse (souris BALB/c) ont été mises en culture avec du SL929 et RANKL durant 6 jours afin de générer des OSLs matures ou des macrophages (conditionnement avec SL929 uniquement, contrôle négatif), et stimulées sans ou avec HE à des concentrations de 5.75, 11.5 et 23 μM. Au jour 6, les cellules ont été fixées à la PFA et marquées pour l'acide phosphatase tartrate résistante (TRAP5b). Les cellules marquées pour l'ensemble des conditions sont présentées en (A) (objectif 10X) (cellule positive : rose/violette, négative : blanche), et la quantification associée des OSLs matures (cellule multinucléée avec au moins 3 noyaux et positive pour le marquage TRAP5b) présentée en (B). Les résultats proviennent de 3 expériences distinctes réalisées en triplicata. Les analyses statistiques ont été effectués à l'aide d'un test statistique Kruskal-Wallis, avec *P<0,05, **P<0,01 et ***P<0,001 (n=3).

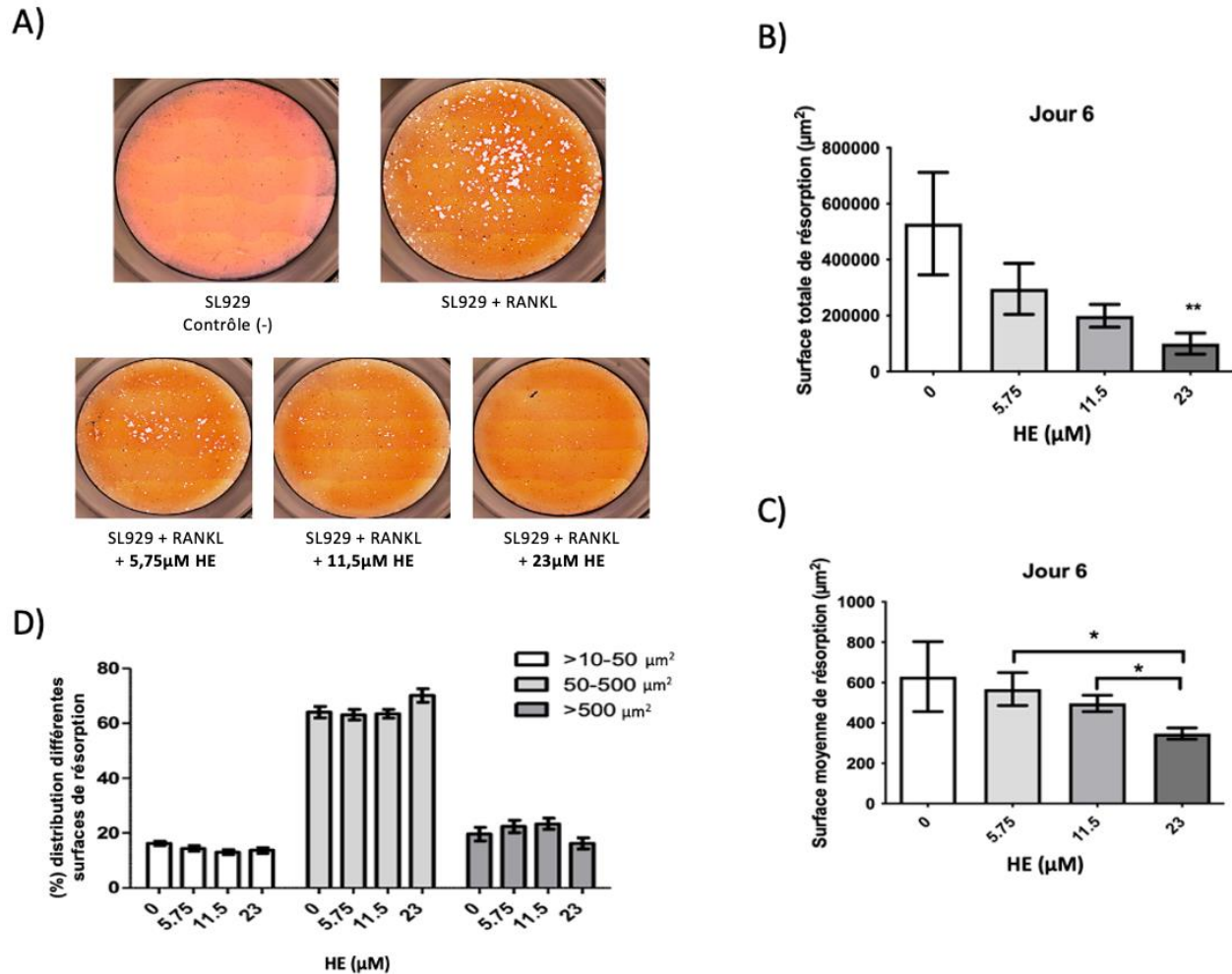


Figure 3.2 À 23µM, l'HE inhibe significativement la capacité de résorption des nouveaux ostéoclastes.

Les cellules non adhérentes de la moelle osseuse (souris BALB/c) ont été mises en culture durant 6 jours sur une matrice de calcium phosphate en présence de SL929 et de RANKL, et conditionnées avec ou sans HE à une concentration de 5,75, 11,5 ou 23 µM. Le milieu a été changé aux 3 jours. Au jour 6, les cellules ont été enlevées et la matrice a été marquée au rouge d'alizarine afin de détecter la présence des fosses de résorptions. Blanc : fosse de résorption (matrice dégradée), Orange rouge : matrice non dégradée. Les images présentées en (A) correspondent aux matrices marquées pour la condition contrôle sans OSLs (Contrôle (-)), et pour les conditions SL929 + RANKL sans et avec 5.75, 11.5 et 23 µM d'HE. La quantification de la surface totale dégradée (en μm^2) dans la zone quantifiée par le logiciel NIS est présentée en (B), la surface moyenne des fosses de résorptions (en μm^2) en (C) et le pourcentage de distribution des différentes fosses de résorption selon 3 différentes surfaces (10 et 50, entre 50 et 500 et plus de 500 μm^2) en (D). Les résultats proviennent de 3 expériences distinctes réalisées en triplicata. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test statistique Kruskal-Wallis, avec * $P < 0,05$ et ** $P < 0,01$ ($n=3$).

3.3 L'HE favorise la persistance des ostéoclastes matures

La survie et la régulation des OSCLs matures n'ont pas été documentées dans la littérature. La plupart des études produisant des OSCLs *in vitro* utilisent des protocoles de différenciation de 6-7 jours, à la suite desquels, les cellules sont stimulées ou caractérisées ponctuellement. Afin d'évaluer les besoins en RANKL et en M-CSF pour la survie des OSCLs déjà préétablis, nous avons en premier suivi l'évolution de la culture des OSCLs (générés en condition optimale durant 6 jours en présence de M-CSF et RANKL) du jour 6 au jour 12 avec la présence de M-CSF et RANKL, ou avec un seul ou aucun de ces stimulants.

Nous avons observé que la persistance des OSCLs matures du jour 6 au jour 12 était significativement diminuée pour le conditionnement avec SL929 ($##P<0,01$) ou RANKL seul ($###P<0,01$) et ($***P<0,001$). Une tendance à la baisse a aussi été observée pour le conditionnement avec SL929 + RANKL ($p=0,0578$). Tandis qu'en absence de stimulants (α MEMc), le nombre d'OSCLs est resté maintenu (Fig. 3.3, B).

Après avoir évalué les effets des différents conditionnements sur la persistance des OSCLs du jour 6 au jour 12, nous avons voulu observer si la présence d'HE à 11,5 ou 23 μ M pouvait l'impacter. Ainsi, nous avons précédemment observé que lors du conditionnement avec SL929 + RANKL, le nombre d'OSCLs matures avait tendance à diminuer, toutefois, nous avons remarqué que la présence d'HE à 11,5 ($##P<0,01$) ou 23 μ M ($###P<0,001$) et ($***P<0,001$) augmentait significativement leur nombre par rapport au contrôle en favorisant leur persistance. L'effet contraire a été observé pour le conditionnement avec RANKL, où la présence d'HE a conduit à une perte des OSCLs matures à 11,5 ($\#P<0,5$) et 23 μ M ($##P<0,01$) et ($*P<0,05$). La présence d'HE pour les autres milieux de conditionnement n'a pas significativement affecté la persistance des OSCLs matures (Fig. 3.3, C).

Ainsi, l'analyse de la figure 3.3 nous permet de constater que la présence d'HE favorise la persistance des OSCLs pour la condition SL929 + RANKL, mais est néfaste pour la condition RANKL seul.

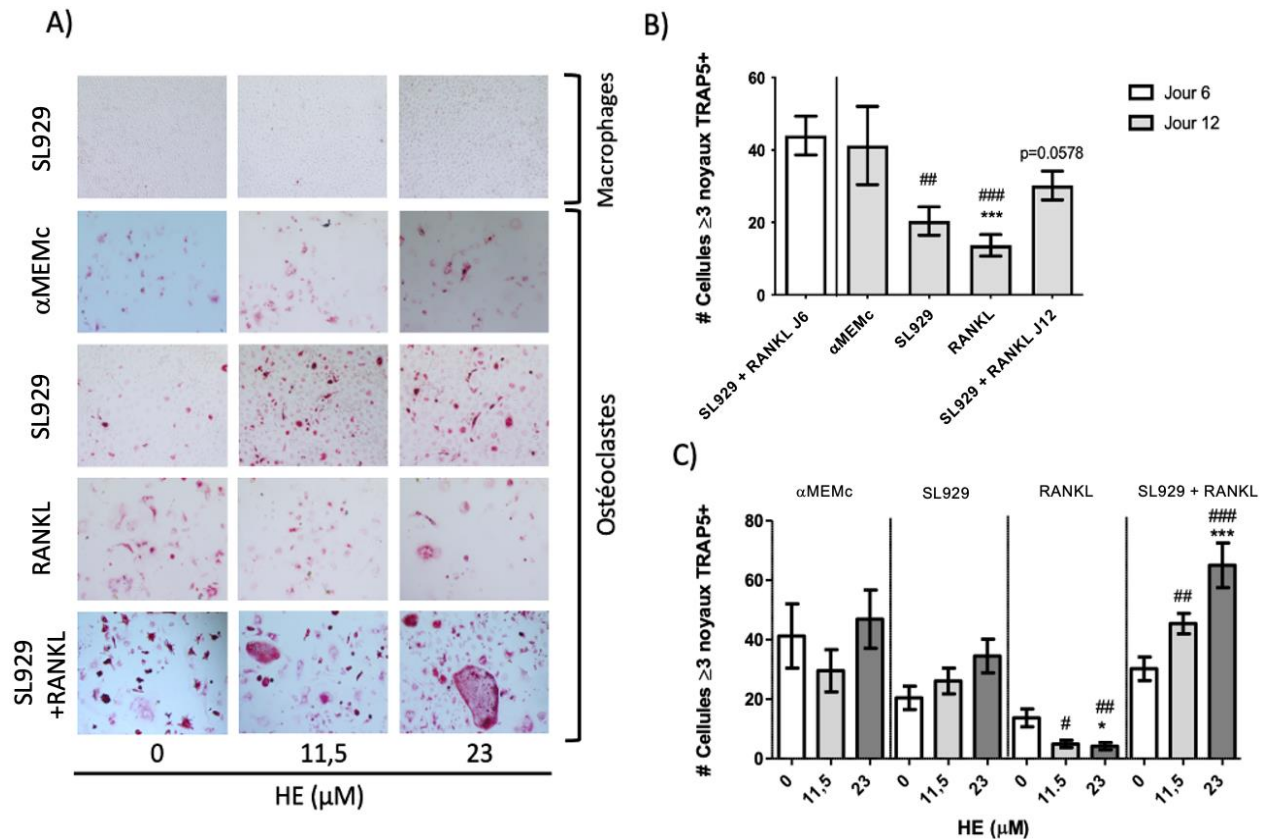


Figure 3.3 L'HE favorise la persistance des ostéoclastes matures.

Les cellules non adhérentes de la moelle osseuse (souris BALB/c) ont été mises en culture et conditionnées avec du SL929 et RANKL durant 6 jours afin de générer des OSLs matures ou des macrophages (SL929 uniquement, contrôle négatif). Puis, à partir du jour 6 jusqu'au jour 12, les cellules ont été conditionnées avec du αMEMc seul ou supplémenté avec du SL929, RANKL ou SL929 + RANKL et stimulées ou non avec de l'HE (11.5 ou 23 μM). Le milieu/conditionnement a été changé aux 3 jours. Au jour 12, les cellules ont été fixées à la PFA et marquées pour l'acide phosphatase tartrate résistante (TRAP5b). Les cellules marquées pour les différentes conditions sont présentées en (A) (cellule positive : rose/violette, négative : blanche), et la quantification associée des OSLs matures (cellule multinucléée avec au moins 3 noyaux et positif pour le marquage TRAP) selon leur conditionnement : αMEMc , SL929, RANKL ou SL929 + RANKL avec ou sans HE (11,5 ou 23 μM) présentées en (B) et (C) respectivement. Les résultats proviennent de 3 expériences distinctes réalisées en triplicata. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test Kruskal-Wallis avec Dunn's Multiple comparaison. (* $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$). Ainsi qu'un test non paramétrique Mann-Whitney. ($P=0,0578$ et # $P<0,05$, ## $P<0,01$, ### $P<0,001$) ($n=3$).

3.4 Une source de M-CSF et de RANKL est nécessaire pour maintenir la résorption ostéoclastique du jour 6 au jour 12.

Dans le but d'étudier la capacité des OSCLs préétablis à dégrader une matrice minéralisée en présence de différents milieux de conditionnement, comme ceux testés pour la survie (α MEMc, SL929, RANKL, SL929 + RANKL), les cellules ont été cultivées sur une matrice minéralisée durant une période totale de 12 jours. Comme attendu, les macrophages n'ont pas dégradé la matrice minéralisée (J12 : Contrôle). Pour toutes les autres conditions, des événements de résorptions ont été mesurés et étaient particulièrement prononcés pour la condition SL929 + RANKL (J12) (Fig. 3.4, A). Les photos présentées sont représentatives de la quantification réalisée en (B), où est analysée la surface totale de résorption pour l'ensemble des conditions au jour 12, comparée au jour 6 (SL929 + RANKL : OSCLs matures générés).

Concernant la résorption totale, elle est restée comparable pour les conditions α MEMc, SL929, RANKL, en se situant aux alentours des 800 000 μm^2 . De plus, elle n'a pas été statistiquement différente du contrôle au jour 6, où la surface totale dégradée par les OSCLs était de 500 000 μm^2 . Ces résultats suggèrent que les OSCLs matures n'ont pas dégradé davantage la matrice minéralisée du jour 6 au jour 12 en présence de ces conditionnements (Fig. 3.4, B). Néanmoins, une hausse significative de la surface totale dégradée a été mesurée au jour 12 pour la condition SL929 + RANKL (** $P < 0,01$). Cette hausse représentait 3 fois plus de résorption par rapport au jour 6 (passage de 500 000 à 1 500 000 μm^2). Ainsi, cette figure montre que la présence simultanée de M-CSF et de RANKL (SL929 + RANKL) est nécessaire pour la résorption des OSCLs matures (Fig. 3.4, B).

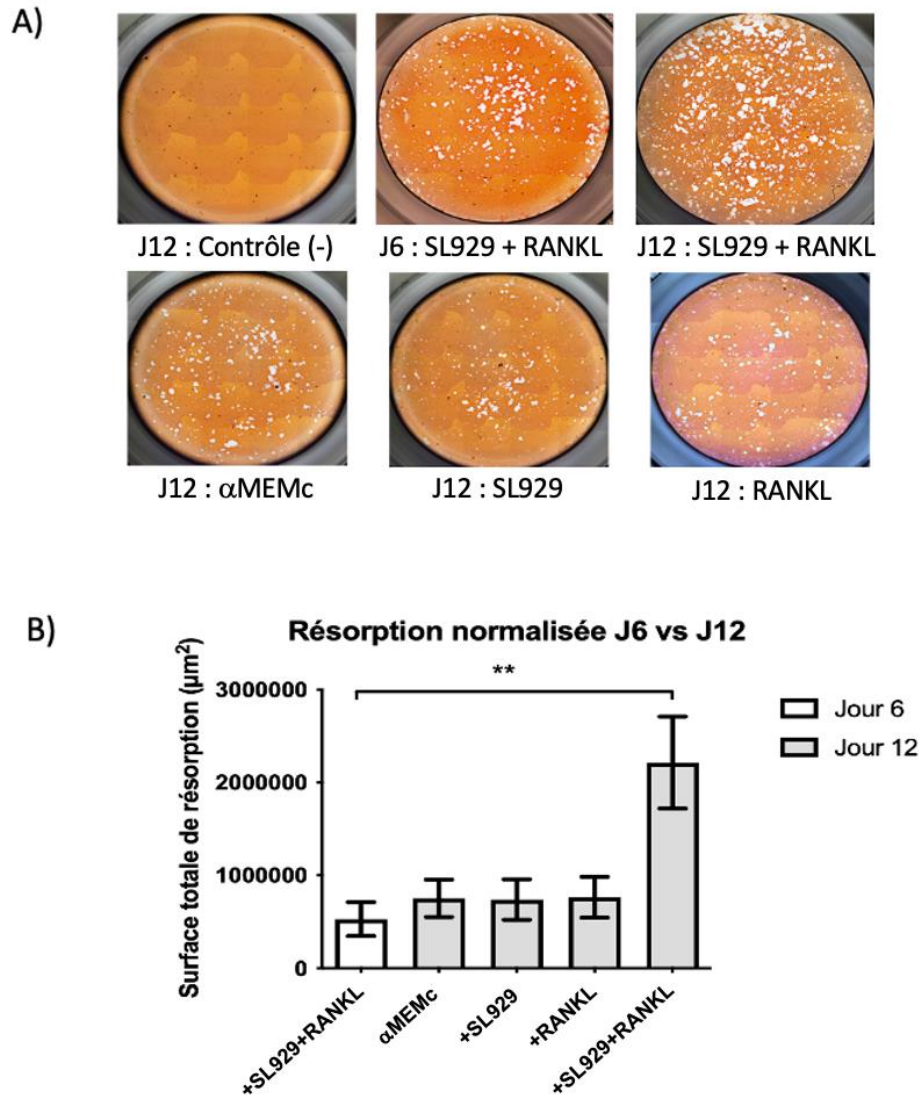


Figure 3.4 Le M-CSF et le RANKL sont nécessaires pour maintenir la résorption ostéoclastique du jour 6 au jour 12.

Les cellules non adhérentes de la moelle osseuse (souris BALB/c) ont été mises en culture sur une matrice de calcium phosphate et conditionnées avec du SL929 et RANKL, ou SL929 uniquement durant 6 jours afin de générer des OSLs matures ou des macrophages (contrôle négatif) respectivement. Puis, à partir du jour 6 jusqu'au jour 12, les cellules ont été conditionnées avec du αMEMc seul, ou supplémenté avec du SL929, RANKL ou SL929 + RANKL (que SL929 pour les macrophages). Le milieu/conditionnement a été changé aux 3 jours. Au jour 12, les cellules ont été enlevées et la matrice marquée au rouge d'alizarine afin de détecter la présence de fosses de résorptions (Blanc : fosse de résorption (matrice dégradée), Orange/rouge : matrice non dégradée). Les matrices marquées sont présentées en (A) pour la condition Jour 6 : SL929+RANKL et pour les conditions du jour 12 : macrophages (contrôle négatif, pas de résorption), αMEMc, seul ou supplémenté avec SL929, RANKL et SL929 + RANKL. La quantification de la surface totale dégradée (en μm²) réalisée par le logiciel NIS est présentée en (B). Les résultats proviennent de 3 expériences distinctes réalisées en triplicata. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test Kruskal-Wallis, avec *P<0,05 et **P<0,01 (n=3).

3.5 L'HE inhibe partiellement la résorption des ostéoclastes matures

Après avoir analysé les effets des différents types de conditionnement sur l'activité de dégradation des OSCLs matures entre le jour 6 et le jour 12, nous avons cherché à savoir si la présence d'HE avait une influence sur cette activité. Pour ce faire, nous avons suivi le même schéma expérimental qui a été effectué pour la figure 3.4, mais en présence ou absence d'HE à 11,5 et 23 μM .

Nous avons observé que pour le conditionnement avec SL929 + RANKL, la présence d'HE à des concentrations de 11,5 ($\#P<0,05$) et 23 μM ($\#\#P<0,01$) était associée à une hausse significative de la surface totale dégradée. Néanmoins, la réalisation d'un autre test, le test Kruskal-Wallis montre tout de même que la résorption en présence de 23 μM est plus faible que celle du contrôle (différence de 1 000 000 μm^2) (avec $*P<0,05$) (Fig. 3.5, A).

En ce qui concerne la surface moyenne de résorption, cette dernière a été augmentée pour le contrôle (SL929 + RANKL) entre le jour 6 (600 μm^2) et le jour 12 (1250 μm^2) ($\#\#P<0,01$). Cette hausse a aussi été observée en comparant le jour 6 avec le jour 12 en présence de 11,5 ($\#\#\#P<0,001$) et 23 μM d'HE ($\#\#\#P<0,001$). Cependant, nous avons constaté que la moyenne de résorption au jour 12 était plus faible lors du conditionnement avec les deux concentrations d'HE par rapport au contrôle ($\$P<0,05$, test non paramétrique Mann-Whitney) (Fig. 3.5, C).

Pour ce qui est des autres conditionnements, nous avons observé qu'ils ne permettaient pas aux OSCLs de dégrader la matrice, ainsi nous avons logiquement constaté que la présence d'HE n'avait aucune incidence sur la surface totale dégradée ainsi que sur la surface moyenne de résorption entre le jour 6 et le jour 12 (Fig. 3.5, B, D).

Ces résultats montrent que la présence d'HE n'empêche pas l'augmentation de la résorption totale et de la surface moyenne de résorption entre le jour 6 et le jour 12, même si l'augmentation de ces paramètres n'est pas aussi importante que la condition contrôle SL929 + RANKL.

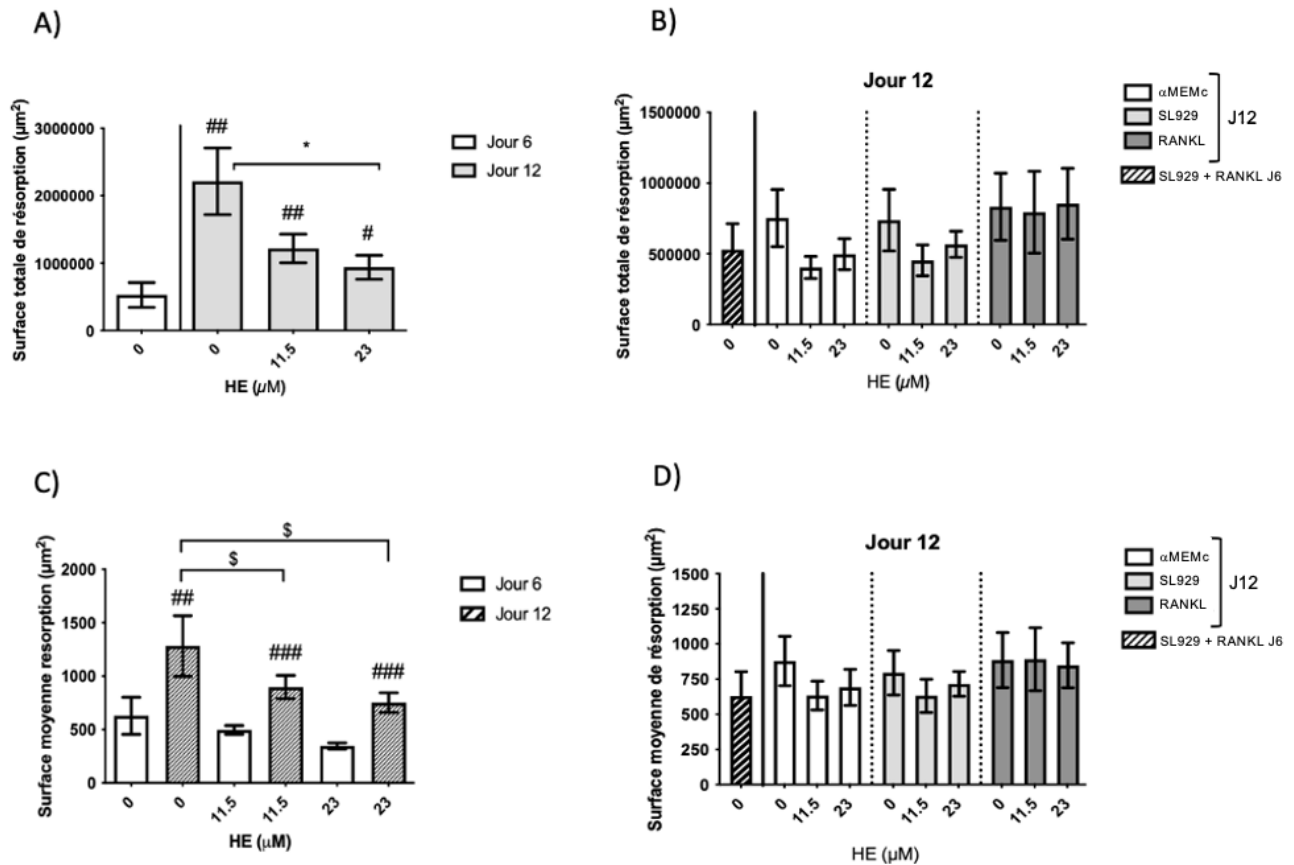


Figure 3.5 L'HE inhibe partiellement la résorption des ostéoclastes matures.

Les cellules non adhérentes de la moelle osseuse (souris BALB/c) ont été mises en culture sur une matrice de calcium phosphate et conditionnées avec du SL929 et RANKL, ou SL929 uniquement durant 6 jours afin de générer des OSLs matures ou des macrophages (contrôle négatif) respectivement. Puis, à partir du jour 6 jusqu'au jour 12, les cellules ont été conditionnées avec du αMEMc seul, ou supplémenté avec du SL929, RANKL ou SL929 + RANKL (que SL929 pour les macrophages) et stimulées ou non avec de l'HE (11.5 ou 23 μM). Le milieu/conditionnement a été changé aux 3 jours. Au jour 12, les cellules ont été enlevées et la matrice marquée au rouge d'alizarine afin de détecter la présence des fosses de résorptions. La quantification de la surface totale de résorption et de la surface moyenne de résorption (μm²), en absence ou en présence d'HE (11,5 ou 23 μM) sont présentées en (A) et (C) respectivement pour la condition : SL929 + RANKL et en (B) et (D) pour les conditions : αMEMc, SL929 et RANKL. Les résultats proviennent de 3 expériences distinctes réalisées en triplicata. Deux analyses statistiques ont été effectuées : le Kruskal-Wallis ((A) comparaison entre les conditions du jour 12). *P<0,05, et un test non paramétrique Mann-Whitney (comparaison par condition jour 12 vs jour 6 (A et C) #P<0,05, ##P<0,01, ###P<0,001 ; comparaison entre les conditions du jour 12 (C). \$P<0,05 (n=3).

3.6 L'HE n'affecte pas la distribution des fosses de résorptions

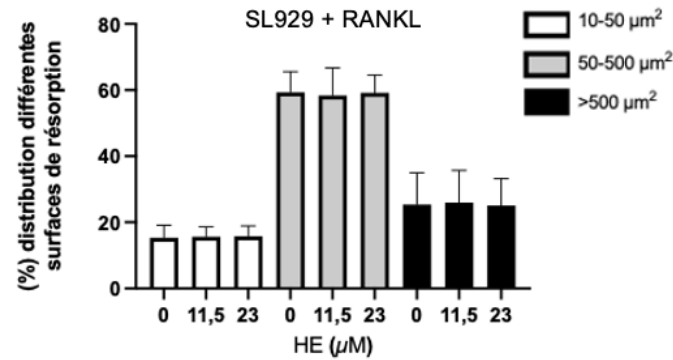
Après avoir évalué l'effet de l'HE sur la surface totale dégradée ainsi que la moyenne de résorption, nous avons voulu étudier son effet sur la tendance des OSCLs matures à effectuer des fosses de résorptions de différentes catégories au jour 12 (pour des surfaces comprises entre 10 et 50, entre 50 et 500 et supérieures à 500 μm^2), en présence ou en absence d'HE (11,5 et 23 μM) (Fig. 3.6)

Nous avons constaté que pour le conditionnement avec SL929 + RANKL, 40% des événements de résorption représentaient soit une surface comprise entre 10 et 50 μm^2 (20%) ou soit une surface supérieure à 500 μm^2 (20%). Et que la majorité des fosses de résorptions (60%) se situaient entre 50 et 500 μm^2 . De plus, la présence d'HE à 11,5 et 23 μM HE n'affectait pas ces paramètres (Fig. 3.6, A).

De la même manière, les autres conditionnements présentaient le même profil de distribution et la présence ou l'absence d'HE n'avait pas eu d'influence sur ces paramètres (Fig. 3.6, B).

Ainsi, les résultats des figures 3.4 à 3.6 portant sur l'étude de la résorption des OSCLs matures ont montré que seul le conditionnement avec SL929 + RANKL permet la maintenance de la résorption en absence ou en présence d'HE à 11,5 et 23 μM du jour 6 au jour 12.

A)



B)

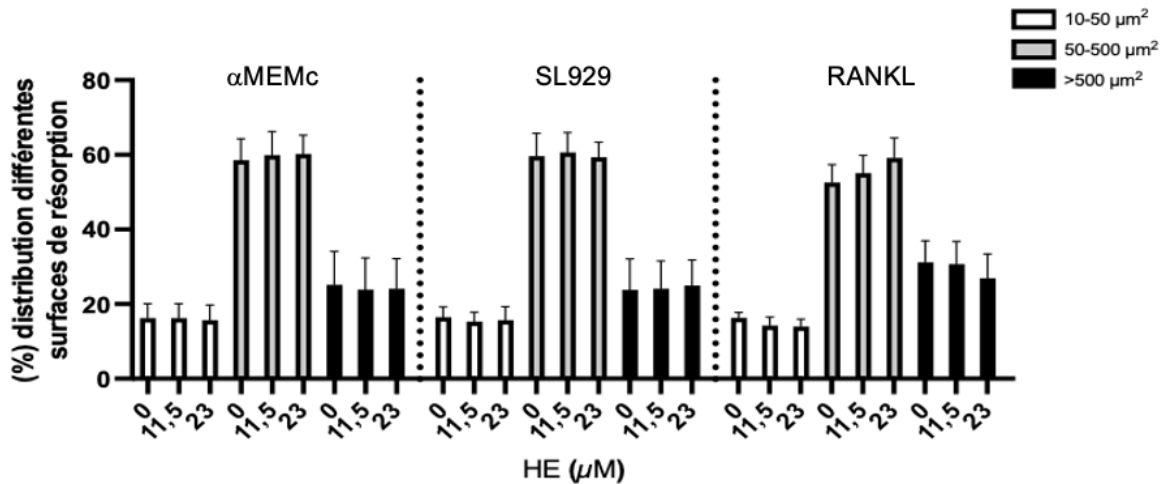


Figure 3.6 La distribution des tailles des fosses de résorption générées par les ostéoclastes matures n'est pas affectée par l'HE.

Les cellules non adhérentes de la moelle osseuse (souris BALB/c) ont été mises en culture sur une matrice de calcium phosphate et conditionnées avec du SL929 et RANKL, ou SL929 uniquement durant 6 jours afin de générer des OSLs matures ou des macrophages (contrôle négatif) respectivement. Puis, à partir du jour 6 jusqu'au jour 12, les cellules ont été conditionnées avec du αMEMc seul, ou supplémenté avec du SL929, RANKL ou SL929 + RANKL (que SL929 pour les macrophages) et stimulées ou non avec de l'hémine (HE) (11,5 ou 23 μM). Le milieu/conditionnement a été changé aux 3 jours. Au jour 12, les cellules ont été enlevées et la matrice marquée au rouge d'alizarine afin de détecter la présence des fosses de résorptions. La quantification de la distribution de la surface des fosses de résorptions selon 3 catégories en absence ou en présence d'HE (11.5 et 23 μM) est représentée en (A) pour la condition SL929 + RANKL et en (B) pour la condition αMEMc seule, ou supplémentée de SL929 ou de RANKL. Les résultats proviennent de 3 expériences distinctes réalisées en triplicata (n=3).

3.7 L'HE n'inhibe pas la résorption des ostéoclastes matures

Dans la cadre de cette étude, nous avons mis au point une nouvelle approche de quantification qui repose sur l'utilisation d'un marqueur calcique fluorescent, la calcéine. Cette substance permet de déterminer l'activité de dégradation de la matrice minéralisée en temps réel sans perturber l'intégrité des OSCLs. En effet, la méthode de Maria et al., 2013, nécessite de décoller et de lyser les cellules pour accéder à la matrice ; ainsi, les manipulations au jour 6 et 12 correspondaient donc à deux manipulations distinctes. Ainsi, en utilisant la calcéine, l'activité de résorption déterminée au jour 6 et au jour 12 est réalisée par les mêmes cellules sur le même puits, ce qui réduit la variabilité.

De la même manière, nous avons évalué l'effet des différents milieux conditionnements avec ou sans HE sur la surface de totale ainsi que sur la moyenne de résorption (Fig. 3.7). La même démarche expérimentale a été utilisée pour générer les OSCLs matures et les conditionner avec du α MEMc seul, ou supplémenté avec du SL929, RANKL ou SL929 + RANKL en présence ou absence de 11,5 et 23 μ M HE.

En ce qui concerne la surface totale de résorption (μm^2), nous avons observé que le conditionnement des OSCLs matures du Jour 6 jusqu'au jour 12 avec du α MEMc, SL929 ou RANKL seul, ne permet pas la dégradation de la matrice par les OSCLs, qui reste à une surface comparable à l'activité de résorption du jour 6 ($1 \times 10^6 \mu\text{m}^2$). Tandis que pour la condition SL929 + RANKL, le jour 6 se situait également aux environ de $1 \times 10^6 \mu\text{m}^2$, mais au jour 12 la résorption totale était environ 5 fois plus importante, avec ou sans HE (11,5 et 23 μ M). La présence d'HE n'affectait pas les OSCLs matures qui ont continué la dégradation la matrice minéralisée (Fig. 3.7, A).

Dans le cadre de la surface moyenne de résorption (μm^2), nous avons remarqué que pour l'ensemble des conditions (SL929 + RANKL compris) au jour 6 et au jour 12, la moyenne de résorption se situait aux alentours de $800 \mu\text{m}^2$ et n'était pas affectée par la présence d'HE.

De manière générale, les résultats représentés dans cette figure confirment la tendance des OSCLs à préserver leur activité de résorption pour la condition SL929 + RANKL et ce même en présence d'HE à 11,5 et 23 μ M ; néanmoins, cette figure est représentative d'une seule expérience indépendante réalisée en triplicata, donc des effets significatifs ne peuvent pas être soulignés (Fig. 3.7, B).

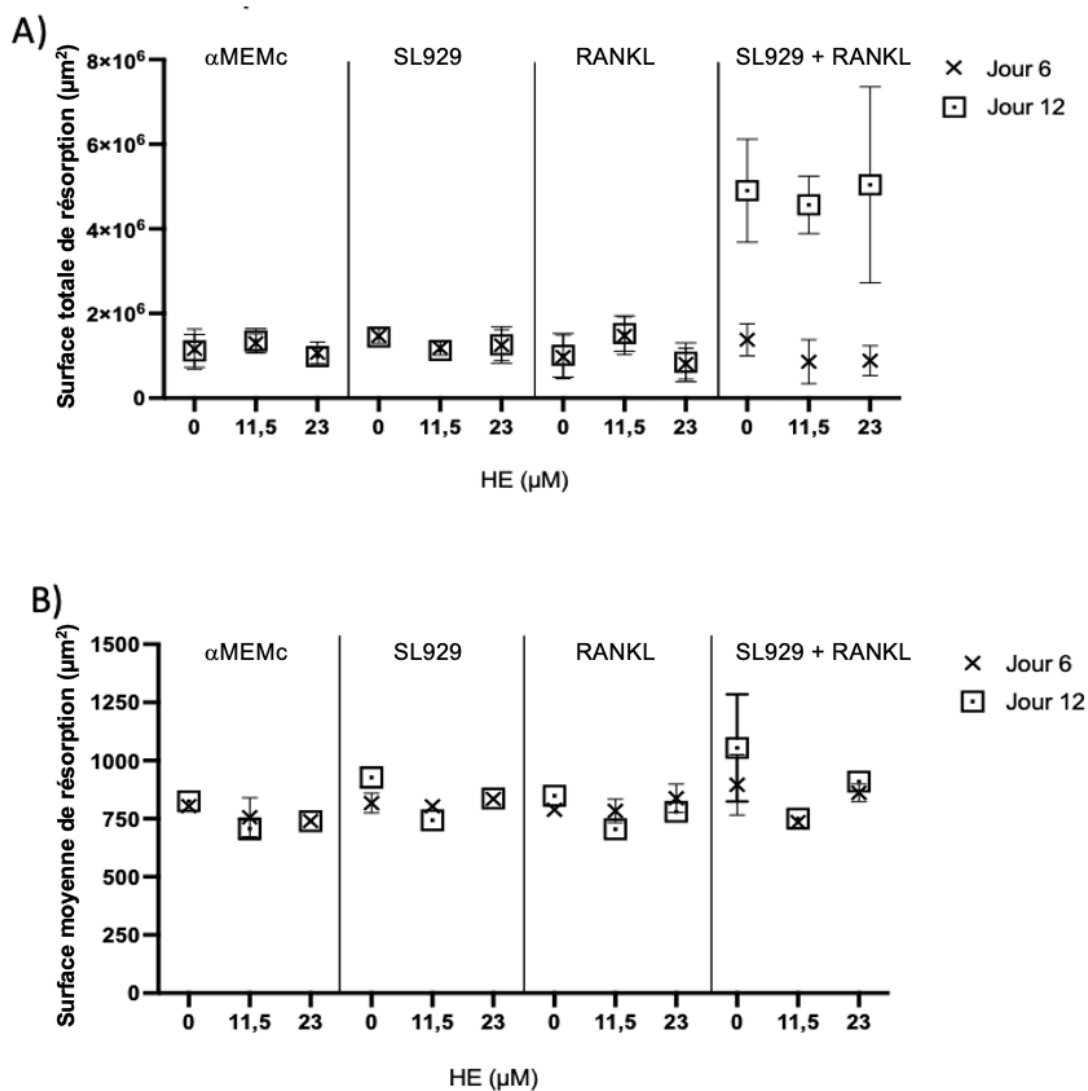


Figure 3.7 L'HE n'inhibe pas la résorption des OSCLs matures.

Les cellules non adhérentes de la moelle osseuse (souris BALB/c) ont été mises en culture sur une matrice de calcium phosphate pré-marquée avec de la calcéine (marqueur calcique fluorescent) et conditionnées avec du SL929 et RANKL, ou SL929 uniquement durant 6 jours afin de générer des OSCLs matures ou des macrophages (contrôle négatif) respectivement. Puis, à partir du jour 6 jusqu'au jour 12, les cellules ont été conditionnées avec du αMEMc seul, ou supplémenté avec du SL929, RANKL ou SL929 + RANKL (que SL929 pour les macrophages) et stimulées ou non avec de l'HE (11,5 ou 23 µM). Le milieu/conditionnement a été changé aux 3 jours. Au jour 6 et au jour 12, les matrices marquées ont été prise en photo par microcopie à fluorescence (pas nécessaire d'enlever les cellules avec cette méthode). La quantification de la surface totale de résorption (µm²) en absence ou en présence d'HE (11.5 ou 23µM) est présentée en (A) et la surface moyenne de résorption (µm²) présentée en (B) pour l'ensemble des conditions pour le jour 6 et le jour 12 : αMEMc, SL929, RANKL ou SL929 + RANKL. Les résultats de cette cinétique proviennent d'une seule expérience réalisée en triplicata (n=1).

3.8 L'HE et le RANKL induisent l'adoption de certains marqueurs suggérant la sénescence chez les cellules RAW 264.7

Il a été démontré que les OSCLs adoptaient un profil de cellule sénescence lors de l'ostéoclastogénèse, en raison de l'arrêt de la division cellulaire, d'une activité métabolique importante, de la sécrétion de SASPs (métalloprotéinases (MMP-9) et de l'expression de la SA- β -galactosidase et d'autres marqueurs de sénescence (p21, p53). Ce concept a été souligné par trois articles dans la littérature, mais pas chez la lignée de monocyte/macrophage RAW 264.7 (Chen et al., 2007 ; Gorissen et al., 2019 ; Lee et al., 2021). C'est pourquoi nous avons voulu confirmer cela et étudier l'effet que l'HE pourrait avoir sur ces paramètres. La lignée RAW 264.7 est utilisée pour générer des OSCLs matures (Tong et al., 2020 ; Lampiasi et al., 2021 ; Watahiki et al., 2021), néanmoins, malgré l'utilisation de plusieurs protocoles, nous avons uniquement obtenu des cellules multinucléées TRAP négatives. Ainsi ces cellules étant TRAP (-), le terme d'OSCL ne sera pas utilisé pour cette partie.

Les cellules RAW 264.7 ont été mises en culture durant 6 jours et stimulées ou non avec HE, RANKL, HE et RANKL, ou du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Comme attendu, nous avons constaté que peu de cellules étaient positives pour la SA- β -galactosidase dans la condition de contrôle, contrairement aux autres conditions (Fig. 3.8, A). Ces images sont représentatives de la quantification présentée en (B).

Nous avons constaté qu'en absence de stimulation (CT), une partie des cellules (4%) montrent un phénotype de cellule sénescence. Cependant, la stimulation à l'HE ou RANKL a augmenté significativement le nombre de cellules positives au marquage, respectivement, 10 et 7% (# $P < 0,05$). Cette augmentation était accentuée en présence de RANKL + HE (22%), et comparable à la SA- β -gal induite par le contrôle positif H_2O_2 (connu pour induire un stress oxydatif et d'initier la sénescence). Cela démontre que la présence de RANKL ainsi que son action synergique avec l'HE favorisent l'expression de la SA- β -gal chez les cellules RAW 264.7 (Fig. 3.8, B).

Par la suite, nous avons voulu vérifier si l'augmentation d'expression de la SA- β -galactosidase était corrélée à la surexpression d'autres marqueurs de sénescence par qPCR (p21, p53, IL-6 et IL-1 β), tout en respectant les mêmes conditions de culture et de stimulation (Fig. 3.8, C). Dans le cas de l'HE, nous n'avons pas constaté de variation pour les gènes p21 et p53, mais une légère diminution d'expression pour les gènes IL-6 et IL- β .

Pour la condition RANKL, p21 ne semblait pas être affectée, mais p53, IL-6 et IL-1 β (3x) étaient plus exprimées. En présence de RANKL + HE, p21 était peu affecté, toutefois nous avons remarqué une légère hausse d'expression de p53 (1,5x), suivie de l'IL-1 β (1,8x) et de l'IL-6 (2,5x). Enfin, pour le contrôle positif H₂O₂, où la sénescence cellulaire avait été induite, nous avons remarqué une légère hausse de p21 (1,25x) et p53 (environ 1,9x). Mais une très forte expression de l'IL-1 β qui était environ 7 fois plus exprimée que le contrôle sans stimulation.

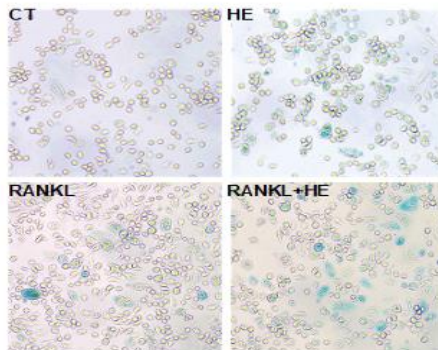
Ces résultats montrent que l'expression des différents marqueurs de sénescences ne sont pas augmentés en présence d'HE et tendent à être diminués, seule l'action de RANKL ou de RANKL + HE a démontré une augmentation d'expression de l'IL-6 et de l'IL-1 β . Néanmoins, les résultats de cette figure doivent être considérés comme des tendances, car aucun test statistique n'a été réalisé.

3.9 L'HE n'affecte pas la migration des cellules RAW 264.7

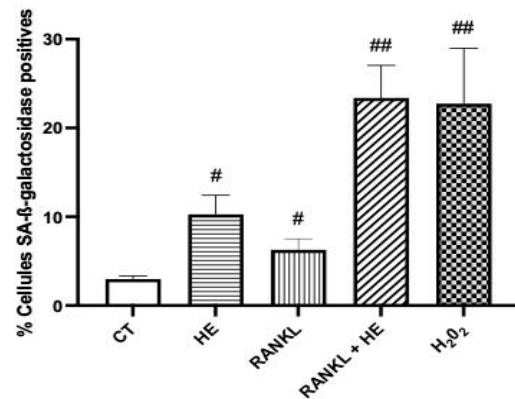
Afin d'étudier l'effet de l'HE sur la migration cellulaire, nous avons utilisé la lignée cellulaire RAW 264.7, les cellules ont été mises en culture jusqu'à confluence, puis une égratignure de la monocouche cellulaire a été réalisée afin d'observer leur capacité à recouvrir cet espace nouvellement vacant en absence (DMEMc) ou en présence d'HE à 5,75, 11,5 et 23 μ M.

Pour chaque graphique, le profil migratoire des RAW 264.7 avec DMEMc seuls a été comparé au profil migratoire lors de la stimulation avec 5,75, 11,5 et 23 μ M d'HE. Ainsi, nous avons constaté que la stimulation à l'HE pour les différentes concentrations n'affectait pas la migration des RAW 264.7. Cependant, nous avons observé que la migration cellulaire des RAW 264.7 à 11,5 et 23 μ M tendait à être plus fortement impactée qu'à 5,75 μ M (Fig. 3.9).

A)



B)



C)

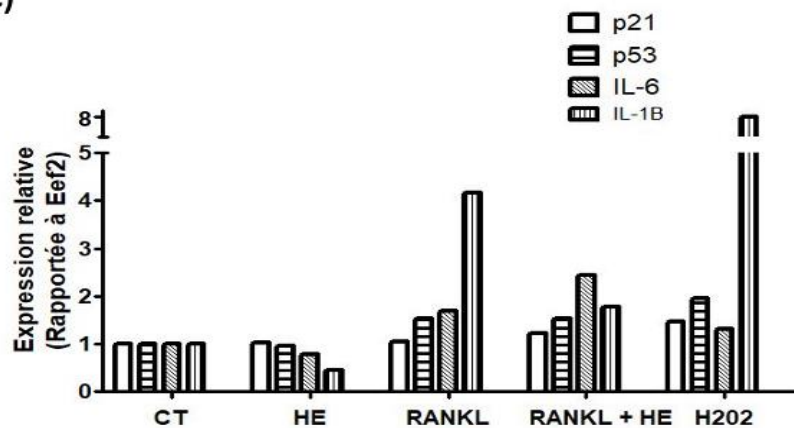


Figure 3.8 L'HE et le RANKL induisent l'adoption de certains marqueurs de sénescence chez les cellules RAW 264.7.

Les cellules ont été stimulées avec de l'HE (23 μ M), du RANKL (50 ng/ml), du RANKL + HE ou sont restées sans stimulation (CT). Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (150 mM durant 2h) a été utilisé comme contrôle positif. Six jours après la stimulation, les cellules ont soit : 1) été marquées pour la SA- β -gal (sénescence associée à la β -galactosidase) et prises en photos au microscope confocal (A). Le pourcentage de cellules positives pour la SA- β -gal (cellules bleues) a été quantifié et présenté en (B). 2) Ou subies une extraction d'ARN dans du Trizol et une rétrotranscription en ADNc. Une qPCR a ensuite été réalisée pour évaluer l'expression relative des marqueurs de sénescence (Eef2 : gène de référence, p21, p53, IL-6 et IL-1 β (séquences amorces, voir annexe A)) (C). Les résultats présentés en (A) et (B) proviennent de deux expériences distinctes ; où pour chaque condition, par expérience, 5 régions différentes ont été quantifiées, où 300 cellules ont été comptées. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test non paramétrique Mann-Whitney. # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$. (Comparaison des conditions par rapport au contrôle sans stimulation (CT ou Ctrl) ($n=2$)). Les résultats présentés en (C) proviennent d'une seule expérience distincte, les courbes de fusions et le profil sur gel d'agarose ont été vérifiés (gel agarose avec différentes amorces, voir annexe B) ($n=1$). Les amplicons obtenus sont spécifiques.

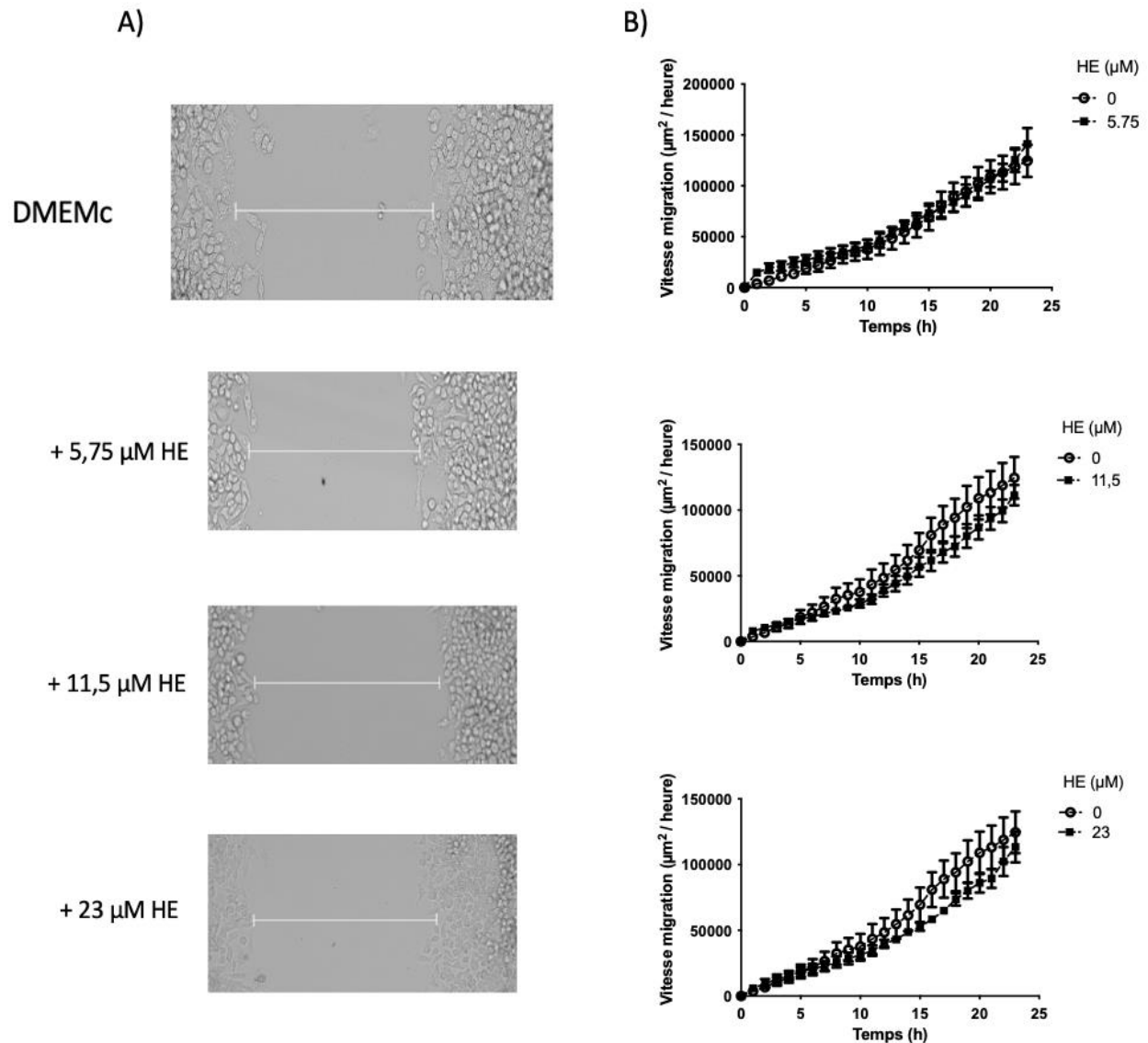


Figure 3.9 L'HE n'affecte pas la migration des cellules RAW 264.7.

Les cellules ont été cultivées jusqu'à leur confluence, et une égratignure au centre de la monocouche a été réalisée. Ensuite, les cellules ont été conditionnées avec du DMEMc en absence ou en présence de 5.75, 11.5 ou 23 μM d'HE pendant 24 heures (A) (les barres blanches illustrent l'espace non recouvert par les cellules après 24 heures pour les différentes conditions). Les données ont été analysées et sont présentées en (B) où la vitesse de migration des cellules (exprimée en $\mu\text{m}^2/\text{heure}$) au sein de l'espace disponible a été mesurée en fonction du temps (heures). Les résultats relatent d'au moins 5 expériences indépendantes ($n=5$). Les tests statistiques n'ont démontré aucune différence significative entre les différents traitements.

DISCUSSION

L'étude préliminaire réalisée par Moreau et al., 2012, ainsi que les données de notre laboratoire indiquent que l'hème libre et l'HE inhibent la différenciation des OSCLs *ex vivo* et *in vitro*. Trois conditions caractérisées par des niveaux importants d'HE en circulation (malaria aiguë, hémolyse par phenylhydrazine, et injection d'HE chez la souris) sont aussi caractérisées par un déséquilibre du remodelage qui se résume en une formation déficiente des os sans impact majeur sur la résorption. En tenant en considération ces observations, l'objectif majeur de ce projet était de documenter l'effet de l'HE sur la survie des OSCLs déjà préformés, et d'évaluer son impact sur l'activité de résorption des OSCLs en différenciation ou déjà différenciés *in vitro*. En parallèle, nous avons étudié l'effet de l'HE sur l'adoption d'un profil de cellule sénescence et sur la migration cellulaire des RAW 264.7.

En ce qui concerne l'influence de l'HE sur l'ostéoclastogénèse, nous avons validé son action inhibitrice sur ce processus (Figure 3.1). Ces résultats sont en accord avec des études déjà réalisées, où Zwerina et al., 2005 et Bak et al., 2017 ont reporté que l'HE inhibe la formation des OSCLs. De plus, Zwerina et al., 2005 ont démontré que cette inhibition n'était pas due à un effet cytotoxique de l'HE vis-à-vis des précurseurs des OSCLs, mais plutôt à une inhibition de leur fusion. Ces auteurs ont justifié que l'inhibition de l'ostéoclastogénèse était conséquente à l'augmentation d'expression de l'HO-1, à la suite de la présence de son substrat l'hème/HE, ou à cause du stress oxydatif (Wu et al., 2019). L'expression de cette enzyme inhibe le facteur de transcription NF- κ B, ce qui conduit à une baisse d'expression du facteur de transcription NFATc1 (facteur majeur dans la formation des OSCLs), ainsi que des gènes ostéoclastiques associés (OC-STAMP, DC-STAMP, CTK, TRAP) (Figure 3.3) (Bak et al., 2017). À ce sujet, Sakai et al., 2012, ont reporté une diminution notable de l'expression de l'HO-1, 24-72 heures après stimulation avec le M-CSF et le RANKL, cette diminution étant suivie de la libération d'une protéine liant la chromatine et régulant la transcription, la boîte collective haute mobilité 1 (HMGB1, *High Mobility Group Box*), intervenant dans la différenciation des précurseurs en OSCLs. Ces résultats sont en accord avec le fait que l'utilisation d'ARNs interférents, dirigés contre l'HO-1, conduit à une hausse de la formation d'OSCLs. En conclusion, l'expression de la HO-1 serait contreproductive pour le développement des OSCLs.

Dans ce contexte, la diminution de la capacité des OSCLs néoformés à dégrader la matrice minéralisée en présence d'HE suit également ce raisonnement, car si moins d'OSCLs sont formés, moins de résorption a lieu, d'où une diminution de la surface totale et de la surface moyenne de résorption pour la concentration

à 23 μM ; néanmoins, le profil de distribution des fosses de résorption selon différentes surfaces n'a pas été impacté. Dans le cadre de ces manipulations, nous avons distingué trois « groupes », la majorité (60 %) permet la réalisation de fosses de résorption comprises entre 50 et 500 μm^2 , et une minorité (20%) permet la réalisation de fosses de résorptions inférieures à 50 ou supérieures à 500 μm^2 . En considérant l'existence des ostéomorphes, il est possible que l'évolution de ces « groupes » soit dynamique dans le temps, les plus gros OSCLs peuvent être perçus comme des réservoirs de futurs ostéomorphes qui, lorsque relâchés vont être recyclés et former des nouveaux OSCLs ou compléter des OSCLs matures existants. Ces éléments contribuent donc au recyclage et à l'évolution des OSCLs matures au cours du temps.

Par la suite nous avons étudié l'incidence des différents conditionnements (αMEMc , SL929, RANKL ou SL929 + RANKL) sur la persistance et la capacité de dégradation des OSCLs matures, un sujet peu étudié. Cela est intéressant, car dans un contexte *in vivo*, nous avons vu que lors de conditions hémolytiques et en présence d'HE, la formation des OSBs est diminuée (Baldenzi et al., 2011 ; Moreau et al., 2012 ; Smith-Guzmán, 2015 et Taher et Saliba, 2017), or ces dernières sont une partie des cellules produisant le M-CSF et le RANKL. Si la population des OSBs est réduite, on peut s'attendre à une baisse de la production et de la disponibilité de ces deux stimulants. C'est pourquoi nous avons voulu évaluer si l'absence ou la présence d'un seul, ou des deux stimulants permettait aux OSCLs de survivre et de pouvoir dégrader la surface osseuse. Cela a été réalisé tout en adressant les effets potentiels de l'HE sur ces deux paramètres, étant donné que l'HE induit l'expression de l'HO-1, une enzyme antioxydante et connue pour ses effets anti-apoptotique (Brouard et al., 2000 ; Morse et al., 2009 ; Wang et al., 2010), son induction pourrait affecter la durée de vie des OSCLs en absence ou présence des différents stimulants.

Nous avons remarqué que pour l'ensemble des conditions testées, l'absence de stimulants (αMEMc) permettait de maintenir la persistance des OSCLs matures du jour 6 au jour 12, néanmoins, le conditionnement avec du SL929 ou RANKL seul induisait une diminution du nombre d'OSCLs matures, tendance aussi observée pour la condition SL929 + RANKL (Figure 3.5). Toutefois, le fait qu'un OSCL mature soit présent ne signifie pas qu'il est apte à dégrader une matrice minéralisée. Ainsi, pour l'ensemble des traitements, nous avons démontré que seul le conditionnement avec SL929 + RANKL permettait une activité de résorption correspondant à la dégradation de la matrice entre le jour 6 et le jour 12.

Ce résultat suggère donc que les deux voies de signalisations doivent être stimulées afin de maintenir l'expression des gènes ostéoclastiques impliqués dans l'activité de résorption des OSCLs matures (Boyce

et al., 2013 ; Renama et al., 2016). Cela est important dans un contexte *in vivo*, car cela suggère que l'absence de RANKL ou de M-CSF suffirait à arrêter la dégradation de la matrice osseuse. Ce qui renforce l'importance et le poids de l'OPG produite par les OSBs, qui agit comme un récepteur leurre et neutralise l'axe RANKL-RANK. De plus, dans cette optique, Ma et al., 2022 ont récemment montré qu'en plus de sa fonction de neutralisation, l'OPG affectait la voie de signalisation des MAPK, ce qui inhibe l'adhésion et la mobilité des OSCLs. Dans ce contexte, il serait intéressant d'évaluer si après une période sans stimulation complète (α MEMc, SL929 ou RANKL), les OSCLs matures pourraient reprendre la dégradation de la matrice minéralisée si ils seraient de nouveau en présence de M-CSF et de RANKL, et si cette stimulation pourrait avoir des conséquences sur leur intensité de résorption (si restituée) ou sur leur viabilité. De manière générale, ces observations ont souligné l'importance de la condition SL929 + RANKL dans le cadre de la régulation des OSCLs matures.

Par la suite, nous avons pu constater que la présence d'HE à 11,5 et 23 μ M influençait la persistance des OSCLs matures lors du conditionnement avec SL929 + RANKL et RANKL seul. Lors du conditionnement avec RANKL, l'ajout d'HE a conduit à une forte diminution du nombre d'OSCLs matures. Le RANKL active la voie de signalisation NF- κ B, voie de signalisation conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires et de ROS (Lee et al., 2005 ; Zhou et al., 2021). D'autre part, l'HE, en plus de sa capacité à oxyder les membranes et à générer du stress oxydatif (Farr et al., 2016 ; Pingolo et Abhishek, 2021), peut se lier à TLR4 et stimuler l'activation de NF- κ B (Bozza et Jeney, 2020) ; TLR4 est exprimé chez les précurseurs d'OSCLs, mais également chez les OSCLs matures (Takami et al., 2002). Ces éléments pourraient perturber l'homéostasie interne des OSCLs.

Dans le cadre du conditionnement avec SL929 et RANKL, nous avons démontré que la présence d'HE a augmenté la persistance des OSCLs pour la condition SL929 + RANKL. Ceci pourrait expliquer pourquoi la résorption totale ainsi que la surface moyenne des fosses de résorption ont été augmentées du jour 6 au jour 12 aussi pour la condition avec HE, malgré le fait que l'activité de résorption a été comparativement plus faible par rapport au contrôle.

En ce qui concerne la moyenne de résorption, nous avons montré que la condition contrôle générait des fosses moyennes d'environ 1200 μ m², tandis que Rumpler et al., 2013 ont quant à eux observé une surface moyenne de 700 μ m². Toutefois, ces différences peuvent s'expliquer par le fait que ces derniers utilisent

des cellules mononucléées d'origine humaine et que l'activité de dégradation a été réalisée sur une surface de dentine, qui se rapproche plus d'un modèle *in vivo*, qui peut être plus résistante à la dégradation.

Ces résultats ressemblent à ceux obtenus avec notre autre technique de quantification reposant sur le principe de l'utilisation de la calcéine, où la résorption observée au jour 6 et 12 a été réalisée par les mêmes cellules au sein du même puit.

En ce qui concerne la distribution des fosses de résorption, nous avons constaté les mêmes profils au jour 12 (Fig. 3.6) par rapport au jour 6 (Fig. 3.2, D), pour l'ensemble des conditions avec ou sans HE. Dans le cas de la stimulation avec le milieu seul (α MEMc), avec SL929 ou RANKL, cela est normal étant donné que seule la condition SL929 + RANKL permet aux OSCLs de perdurer la résorption. Dans le cadre du conditionnement avec SL929 + RANKL, on remarque toutefois que la présence d'HE n'affecte pas ces paramètres. Ainsi, l'effet de l'HE semble être général, et tend à réduire de l'activité de résorption des OSCLs matures sans toutefois l'inhiber à 100%.

Dans son ensemble, ces résultats soulignent l'importance du conditionnement avec SL929 + RANKL et du rôle de l'HE sur la persistance et la résorption des OSCLs matures du jour 6 au jour 12.

Trois suggestions pourraient expliquer pourquoi nous observons plus d'OSCLs lors du conditionnement avec SL929 + RANKL, où la capacité de dégradation est maintenue, mais plus faible que le contrôle.

Premièrement la littérature ainsi que nos résultats confirment le fait que l'HE inhibe la fusion cellulaire (Zwerina et al., 2005 et Bak et al., 2017), ainsi, dans ce contexte l'ensemble des OSCLs matures formés au jour 6 ne peuvent plus fusionner ensemble, tandis qu'en absence d'HE (contrôle), la présence de M-CSF et de RANKL a permis aux événements de fusion de perdurer. Ainsi, les OSCLs fusionnent entre eux pour former de plus gros OSCLs (la fusion entre OSCLs matures a été démontrée par Jansen et al., 2012). Dans cette optique, la condition sans HE présenterait des OSCLs plus gros, mais moins nombreux par rapport à la condition avec HE, où les OSCLs seraient moins gros, mais plus nombreux ce qui pourrait conduire finalement à un niveau de résorption similaire. Néanmoins, dans notre cas, on observe que la présence d'HE favorise la persistance des OSCLs matures, cependant, on retrouve tout de même une résorption moindre comparée au contrôle, suggérant notre deuxième hypothèse.

Deuxièmement, grâce à la littérature, il est désormais établi que lors de leur formation, les OSCLs adoptent un profil sénescence (Chen et al., 2007 ; Gorissen et al., 2019 et Lee et al., 2021). Lee et al., 2021 ont

démontré *in vitro*, que l'ostéoclastogénèse (OSCLs issus de précurseurs de la moelle osseuse de souris C57BL/6J) était corrélée à la hausse d'expression de p16 et p21. Gorissen et al., 2019 ont également pu confirmer cela chez des OSCLs générés *in vitro* à partir de monocytes CD14⁺ humains, où la formation d'OSCLs matures s'accompagne de la hausse d'expression de p21, de l'expression de la SA- β -galactosidase. De plus, une fois matures d'autres marqueurs de sénescences sont exprimés comme la MMP-9 et la chimiokine CCL2. Enfin, l'équipe de recherche de Chen et al., 2007 a observé l'expression de la SA- β -galactosidase lors de la formation d'OSCLs *de novo* à partir de précurseurs situés dans la rate de souris C57BL/6J. De plus, ils ont montré un lien entre le niveau de sénescence, l'intensité de résorption et la viabilité des OSCLs, où une grande activité de résorption est caractérisée par une forte sénescence, mais par une viabilité réduite et inversement. Cependant, ces résultats ont été générés dans un modèle murin 129/Sv visant à reproduire une maladie génétique, la pyconodysostose où les OSCLs n'ont pas de CTK fonctionnelle. Néanmoins, dans une expérience supplémentaire, ils ont démontré que la surexpression de la CTK chez les MOCP-5 (lignée cellulaire précurseur d'OSCLs), était corrélée à la hausse d'expression de p19, p21, p53 et l'expression de la SA- β -galactosidase.

Dans ce contexte, on peut postuler que la présence d'HE permettrait de réduire le niveau de sénescence cellulaire via l'induction de la HO-1 qui agit sur l'activation de NF- κ B, se traduisant par une activité de résorption plus faible, mais une viabilité plus importante. Ces éléments correspondraient à nos observations *in vitro*, où en présence d'HE avec RANKL + SL929, plus d'OSCLs matures sont observés, corrélé à la maintenance de la résorption du jour 6 au jour 12, mais avec une intensité de résorption diminuée par rapport au contrôle. Néanmoins, *in vivo* cela pourrait se traduire par une résorption similaire, car même si elle est plus faible, elle durera plus longtemps, tandis qu'*in vitro*, quand on stoppe la manipulation, tout est arrêté.

Enfin, nous pouvons également suggérer un effet de l'HE sur la migration cellulaire des OSCLs en raison de sa capacité d'oxydation des membranes cellulaires, l'HE pourrait ralentir la migration cellulaire, et dans le cas où l'activité de résorption ne sera pas influencée, alors la surface de dégradation serait moins importante, car moins de mobilité, mais la profondeur de dégradation serait augmentée. Ce qui pourrait potentiellement compliquer le renouvellement de la matrice osseuse par les OSBs dans un contexte *in vivo* et favoriser l'ostéoporose. Lors de notre étude, la profondeur de résorption n'a pas pu être évaluée avec nos matrices, cela reste donc une possibilité envisageable.

L'ensemble de ces résultats confirment l'étude *in vivo* de notre laboratoire (Scorza et al., article en préparation), où la présence d'HE induit une déficience de l'ostéoclastogénèse corrélée à la maintenance de la résorption par les OSCLs matures.

La perte de masse osseuse constatée *in vivo* pourrait aussi être expliquée par l'accumulation d'ostéomorphes. En effet, Mc Donald et al., 2021 ont étudié l'effet du RANKL et de sa neutralisation par l'OPG sur la formation des OSCLs et des ostéomorphes *in vivo*. La présence de l'OPG induit bien la neutralisation de l'axe RANKL-RANK et l'inhibition de l'ostéoclastogénèse, ce qui est en corrélation avec la littérature, néanmoins, ils ont observé une accumulation d'ostéomorphes (cellules filles se séparant des OSCLs matures pour potentiellement en former de nouveaux ou contribuer à l'augmentation de la taille d'OSCLs matures existants (processus de fission)). L'accumulation de ces ostéomorphes lors de la neutralisation de RANKL-RANKL, formerait un réservoir de cellules prêtes à générer ou fusionner avec des nouveaux OSCLs. Puis lorsqu'ils ont enlevé l'OPG, ils ont constaté une augmentation du nombre d'OSCLs formés par rapport à la condition contrôle où l'OPG n'avait pas été administré.

Ils ont argumenté que ce phénomène pourrait être responsable de la perte osseuse accélérée retrouvée chez des patients subissant des thérapies avec du denosumab administré de manière discontinue (un inhibiteur de l'activation de la voie RANKL-RANK). Cela aurait un sens dans le contexte de notre étude, car tout comme l'OPG ou le denosumab, l'HE réduit l'activation de Nf-kB de manière HO-1 dépendante, ce qui inhibe l'ostéoclastogénèse (Zwerina et al., 2005 ; Back et al., 2017 ; Zanchetta et al., 2018). Ainsi, cela pourrait conduire de la même manière à l'accumulation d'un réservoir d'ostéomorphes prêts à fusionner et générer des OSCLs lors de conditions plus favorables. De plus, lors de l'étude de notre laboratoire (Scorza et al., (article en préparation)), nous avons voulu reproduire le comportement de la libération d'hème sous forme libre lors d'une hémolyse, ainsi, l'HE a été injectée plusieurs fois, à des temps différents (Étude de deux semaines, avec injection d'HE les 3 premiers jours de la première semaine et 3 premiers jours de la deuxième semaine, ce qui pourrait accentuer ce phénomène)).

De plus, Mc Donald et al., 2021 ont induit l'apoptose chez des OSCLs *in vivo* par photoablation à deux photons au niveau du tibia et ont remarqué l'arrivée de macrophages afin de phagocyter les OSCLs rentrés en apoptose. Or, il a été montré que les macrophages différenciés peuvent aussi former des OSCLs matures, ce qui en ferait de bons candidats directement impliqués dans la résorption de l'os (Pereira et al., 2018 ; Yang et Yang, 2019). Nous avons également reporté cela dans notre laboratoire, où des macrophages ont été générés à partir de précurseurs de la moelle osseuse du jour 0 au jour 6, puis nous avons testé de conditionner ces derniers avec soit du RANKL + SL929 ou soit du RANKL (voir Annexe D). Ce qui est intéressant est que bien que les macrophages soient différenciés et expriment le récepteur M-CSF,

le conditionnement seul avec du RANKL ne suffit pas à générer des OSCLs matures, mais uniquement la présence de SL929 + RANKL.

Enfin, Il est important de prendre en compte l'environnement osseux dans lequel se trouvent les OSCLs, à savoir la BMU qui est composée d'ostéocytes, de cellules du revêtement osseux et d'OSBs. Bien que l'HE soit capable d'inhiber l'activité des OSBs, il est essentiel d'étudier son impact sur ces autres types cellulaires. Ces dernières années, des études ont mis en évidence l'implication des cytokines, telles que le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-17, dans la régulation du remodelage osseux en favorisant la résorption de l'os, tandis que l'IL-10, l'IL-12 et l'INF- β favorisent sa formation. Il est donc possible que l'HE ait un effet sur la régulation du remodelage osseux à travers son influence sur les différentes cellules de la BMU et les cytokines impliquées.

En ce qui concerne l'effet de l'HE sur la sénescence des RAW 264.7, nous avons montré que l'HE favorise l'expression de la SA- β -galactosidase, définit comme un marqueur sénescence tardif (Pingolo et al., 2021). Cela est aussi valable pour la condition RANKL seule, et accentuée lorsque l'HE est en présence du RANKL, suggérant un effet synergique de ces deux composés. Par ces observations, on tend à confirmer les résultats de Gorissen et al., 2019, où l'ostéoclastogénèse conduit à l'adoption d'un phénotype de cellules sénescence. Néanmoins, malgré l'utilisation des mêmes protocoles et après des tests d'optimisation, la lignée RAW 264.7 de notre laboratoire ne permet pas la formation d'OSCLs comme définie dans la littérature, avec un nombre de noyaux supérieurs à 3 et l'expression de la TRAP. Dans notre cas, on observe bien des cellules multinucléées, mais TRAP négative. Toutefois, cela montre que la fusion favorise l'adoption d'un profil de cellule sénescence et que cette lignée pourrait toujours être utilisée pour étudier la fusion cellulaire. L'implication de la sénescence a aussi été retrouvée chez les trophoblastes, qui fusionnent pour former le syncytiotrophoblaste, intervenant dans le développement du placenta chez l'humain. De plus, la sénescence est induite lors de la fusion, mais est aussi maintenue tout au long du développement de ces cellules, suggérant un rôle important de la sénescence chez l'homéostasie de ces cellules multinucléées (Higuchi et al., 2019).

Comme expliqué précédemment, plusieurs études montrent que lors de leur formation et maturation, les OSCLs adoptent un phénotype de cellule sénescence, en raison de l'adoption de certains marqueurs caractéristiques tel que leur morphologie, la production de protéases, et métalloprotéinases (SASPs) et l'expression de p21 et p53 (Chen et al., 2007 ; Gorissen et al., 2019 et Lee et al., 2021). La formation des OSCLs est permise grâce à une diminution d'expression de l'HO-1 (Sakai et al., 2012). Néanmoins, d'autres

études démontrent que la déficience totale ou partielle du gène de la HO-1 ne permet pas d'accentuer l'ostéoclastogénèse et d'avoir plus d'OSCLs, au contraire. Comme c'est le cas de l'équipe d'Anselmino et al., 2020, où la déplétion de l'HO-1 conduit à une diminution du volume osseux, du nombre et de l'activité des OSBs (cellules produisant la matrice osseuse), mais aussi des OSCLs. En effet, leur nombre et leur activité de résorption se retrouvent diminués. Les auteurs expliquent ce résultat par le fait qu'il y ait moins d'OSBs (une partie des cellules dans l'environnement osseux qui produisent le RANKL et le M-CSF, molécules nécessaires à la formation et la différenciation des OSCLs), néanmoins, on peut considérer la possibilité que l'HO-1 permette la régulation de l'activité et/ou affecte les fonctions des OSCLs matures. Pour ce qui est de la vérification de l'expression des marqueurs sénescents par qPCR, la présence de RANKL contribue à augmenter certains marqueurs (p53, IL-6, IL-1 β), ce qui coïncide avec la littérature et l'adoption d'un profil sénescence, toutefois, en présence d'HE ces marqueurs ont plus tendance à diminuer. Cela est intéressant et justifie le fait d'étudier plusieurs marqueurs caractéristiques de la sénescence pour vraiment confirmer l'adoption de ce profil. La tendance de l'HE à diminuer l'expression de ces marqueurs est consistant avec son effet inhibiteur de l'ostéoclastogénèse (ou processus de fusion cellulaire dans le cadre de notre lignée RAW 264.7 TRAP-).

De plus, de manière intéressante, nous avons constaté que l'HE entraînait une augmentation de l'expression de la β -galactosidase, ce qui indique une sénescence cellulaire, mais qu'en sa présence, une inhibition de l'ostéoclastogénèse est aussi constatée. Par conséquent, cela suggère que différents niveaux de sénescence pourraient avoir des effets différents en fonction du stade de développement des OSCLs, qu'ils soient en formation ou déjà matures.

Pris tous ensemble, ces éléments confortent l'idée d'une étroite relation entre la sénescence et l'induction de l'HO-1 qui intervient dans la formation et la fonction des OSCLs matures. Ces résultats corrélés à la littérature suggèrent que l'HO-1 est induite lors de la sénescence et agit comme mécanisme régulateur des OSCLs.

Enfin, en ce qui concerne l'effet de l'HE sur la migration des cellules RAW 264.7, nous n'avons pas remarqué d'effet significatif. Aucune étude n'a évalué cela chez les RAW 264.7, néanmoins, ces résultats sont consistants avec les observations de Kodagoda et al., 2021 qui ont montré que la présence d'HE à 25 μ M durant 24 heures n'affectait pas la migration cellulaire (chez les cellules épithéliales du côlon normales ou cancéreuses, respectivement (FHS, SW480)). Toutefois, ces derniers ont évalué l'effet de l'HE sur la migration durant 4 jours, et au jour 4, ils ont pu constater un effet inhibiteur de l'HE sur la migration

cellulaire. Une autre étude de Gandini et al., 2018 utilisant une concentration de 20 μ M montre un effet inhibiteur chez la lignée LC3 (lignée cellulaire tumorale hormone-indépendante dérivée d'un adénocarcinome mammaire murin chez des BALB/c), mais aucun sur une autre lignée épithéliale non maligne, les HC11 où aucun effet significatif n'est constaté. Cela montre des résultats variés, mais une tendance à inhiber la migration cellulaire chez certains types cellulaires. Il serait pertinent de vérifier cela sur des cellules primaires.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La dérégulation du remodelage osseux en faveur de la résorption est constatée lors de conditions hémolytiques (drépanocytose, thalassémie, malaria), ou lors de l'injection d'HE *in vivo* chez la souris. Dans ces conditions, une diminution de la formation osseuse corrélée à la maintenance de la résorption de l'os est constatée, mais une diminution de la formation d'OSCLs est également observée. Donc, la résorption de l'os n'est pas affectée par une déficience de la formation de nouveaux OSCLs, seules cellules pouvant dégrader la matrice osseuse. Cela suggère que le conditionnement des OSCLs avec l'HE favorise leur activité de résorption ou leur persistance sur la matrice osseuse, ce qui compenserait la déficience de l'ostéoclastogénèse.

Ainsi, l'effet de l'HE sur les OSCLs matures n'étant pas connu, nous avons voulu étudier les conséquences du conditionnement avec de l'HE sur leur persistance et leur capacité à dégrader une matrice minéralisée. Pour ce faire, nous avons utilisé des précurseurs myéloïdes dérivés de la moelle osseuse de souris BALB/c afin de générer des OSCLs matures, avant de les conditionner avec l'HE.

Les résultats issus de ces manipulations ont permis d'une part de valider le fait que la présence d'HE induit une déficience de l'ostéoclastogénèse, associée à une inhibition de la résorption, puis, d'autre part, d'évaluer deux paramètres, premièrement, le comportement des OSCLs matures sans HE, en présence du conditionnement avec α MEMc seul ou supplémenté avec SL929, RANKL et SL929 + RANKL.

Nos résultats démontrent qu'une fois établis, avec ou sans stimulation, les OSCLs matures arrivent à survivre *in vitro*, hormis la condition où seulement RANKL était présent. Néanmoins, en ce qui concerne leur capacité de résorption, uniquement la présence simultanée de SL929 et de RANKL permet la continuité de la dégradation de la matrice minéralisée par les OSCLs matures. Pris conjointement, ces résultats ont permis d'établir que le milieu de conditionnement optimal pour la réalisation d'études sur les OSCLs matures est celui avec du SL929 (M-CSF) et du RANKL.

Deuxièmement, le conditionnement à l'HE des OSCLs matures n'inhibe pas leur capacité de résorption. En effet, nos résultats démontrent que même avec 11,5 ou 23 μ M d'HE, les OSCLs matures sont capables de dégrader une matrice minéralisée *in vitro* (durant 6 jours dans le cadre de cette étude), en présence d'un

conditionnement optimal (SL929 + RANKL), néanmoins, cette activité perdure, mais est moins prononcée par rapport au contrôle sans HE.

La réalisation de ces manipulations a aussi permis d'optimiser la quantification et l'utilisation des cellules cultivées sur une matrice minéralisée. En effet, grâce à l'utilisation de la calcéine et du prémarquage des matrices avant le dépôt des cellules, nous avons désormais la capacité de mesurer et de quantifier l'activité de résorption de cellules en temps réel, tout en préservant leur intégrité, cela ouvre la possibilité de réaliser des cinétiques en direct à différents temps, mais également de co-marquer les cellules avec d'autres marqueurs viables.

Enfin, parallèlement à ces manipulations, nous avons testé l'effet de l'HE sur l'adoption d'un profil sénescence, ainsi que sur la migration d'une lignée de monocyte/macrophage, les RAW 264.7. Nos résultats soutiennent le fait que l'HE favorise l'adoption d'un profil de cellule sénescence chez cette lignée cellulaire, à la suite de l'expression de la SA- β -galactosidase. Concernant la migration cellulaire, aucune des concentrations testées ne l'impacte significativement.

Pris dans sa globalité, ces manipulations vont dans le sens de notre hypothèse, c'est-à-dire que malgré un effet inhibiteur sur l'ostéoclastogénèse, l'HE stimule la persistance des OSCLs matures. Même si, en sa présence, la dégradation de la matrice par les OSCLs n'a pas excédé la condition contrôle, elle a été maintenue. Ces résultats, corroborés à la littérature, soutiennent les observations de notre laboratoire de recherche et les effets observés *in vivo*.

Toutefois, rappelons que ces manipulations ont été réalisées *in vitro* et l'environnement ainsi que la structure de la matrice osseuse diffère *in vivo*. D'une part, on observe la présence d'autres cellules de la BMU, à savoir les ostéocytes, les cellules du revêtement osseux et les OSBs. D'autre part, la structure de la matrice minéralisée est bien plus complexe. Par conséquent, dans le cadre de futures études il serait intéressant d'utiliser des coupes de dentine, où la densité ainsi que les propriétés physico-chimiques sont plus proches d'un modèle *in vivo*. Avec cette approche il serait envisageable de quantifier la profondeur des fosses de résorption en plus de la surface totale, moyenne et de distribution des fosses selon différents diamètres. Il serait également pertinent de coupler ces analyses avec la quantification d'éléments rémanents (PO_4^- , Ca^{2+}) avant et après la résorption des OSCLs. Cela permettrait d'avoir deux méthodes, directes et indirectes pour quantifier la résorption de la matrice minéralisée.

De plus, des recherches grandissantes précisent le rôle des cytokines et le rôle des cellules immunitaires dans la régulation du remodelage osseux, un concept nommé ostéo-immunologie. L'existence des telles relations élargit ainsi les possibles acteurs directs et indirects impliqués dans sa régulation. Il serait ainsi intéressant d'étudier les conséquences de l'inflammation conjointement avec l'HE sur le remodelage osseux.

En termes de perspectives, il serait pertinent de reproduire les manipulations faites sur les OSCLs matures, sur leur persistance ainsi que sur leur activité de résorption *in vitro*, mais en utilisant cette fois-ci du M-CSF pur à la place du SL929. En effet, malgré son utilisation commune dans la littérature comme source de M-CSF pour générer des macrophages ou OSCLs, plusieurs études ont souligné des différences entre la stimulation par le SL929 et celle avec une version recombinante de M-CSF. De Brito Monteiro et al., 2020 ont démontré que lorsque la différenciation des macrophages était induite avec du SL929, l'ajout de LPS conduisait à la production d'une plus faible quantité de cytokines pro-inflammatoires, et ces cellules présentaient une glycolyse et une consommation plus importante. De plus, il serait intéressant d'étudier si l'HE exerce bien un effet sur la viabilité des OSCLs matures et contribuerai à augmenter leur viabilité par l'intermédiaire de l'HO-1. Dans cette optique, il serait intéressant de confirmer la cinétique de formation des OSCLs que nous avons réalisée juste avant la rédaction de ce mémoire (Voir Annexe D), où nous avons montré qu'au jour 9, 50 OSCLs sont formés en présence de SL929 + RANKL contre 25 au jour 12. En reproduisant cela avec ou sans HE nous pourrions évaluer si sa présence préserve la durée de vie des cellules, auquel cas, nous observerions une diminution moins importante du nombre d'OSCLs entre le jour 9 et le jour 12 en présence d'HE. Dans ce contexte, le rôle de la sénescence chez les OSCLs reste aussi à être mieux établi. Avant tout, il serait nécessaire de confirmer les tendances obtenues par qPCR, mais aussi de reproduire le même schéma expérimental réalisé avec les RAW 264.7, mais sur des cellules primaires, afin de confirmer nos résultats. De plus, même si la littérature met en lumière l'existence de l'adoption d'un profil de cellule sénescence par les OSCLs, peu est connu sur sa fonction précise et son rôle sur la régulation des OSCLs matures. Il est légitime de se demander si l'HE pourrait accentuer ce profil de cellule sénescence engendrant plus de dégradation, mais une vie potentiellement réduite ? Ou au contraire contribuer à la régulation de l'activation de Nf-kB par l'intermédiaire de l'HO-1, ce qui maintiendrait un niveau réduit de sénescence, corrélé à une dégradation de la matrice réduite, mais une durée de vie prolongée, ce qui favoriserait la résorption osseuse ?

Enfin, nous avons confirmé le fait que les macrophages différenciés peuvent former des OSCLs matures en présence de SL929 + RANKL, il est judicieux de se demander si le fait de préconditionner ces macrophages

avec de l'HE, avant de les faire se différencier en présence de SL929 + RANKL (ou M-CSF + RANKL) peut conduire à la formation d'OSCLs plus ou moins nombreux ou actif vis-à-vis de la résorption, car ce phénomène est tout à fait possible *in vivo*.

Les avancées futures permettront de mieux comprendre la régulation complexe du remodelage osseux afin de proposer des solutions adaptées aux personnes souffrants d'un déséquilibre de ce processus en faveur de la résorption ou de la formation.

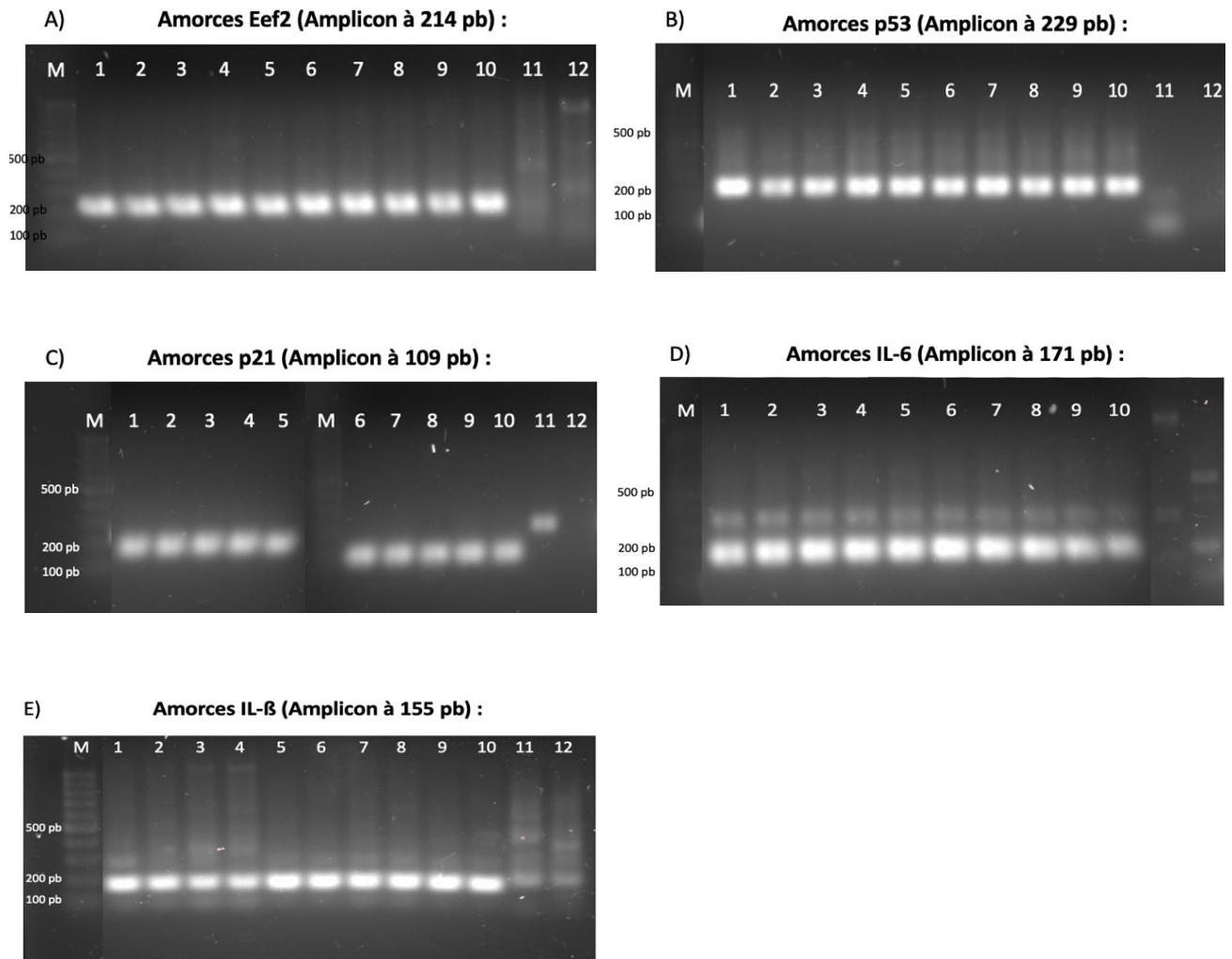
ANNEXE A

Séquences des amorces utilisées pour la PCR et taille attendue

	Sens	Antisens	Taille amplicons
Eef2	GACATCACCAAGGGTGTGCAG	TCAGCACACTGGCATAACAGGC	214
Tm	61.48	62.98	
IL-6	CTTCCATCCAGTTGCCTTC	ATTCCACGATTTCCTCAGAG	171
Tm	55,88	55,42	
p16	CCCAACGCCCCGAACT	GCAGAAGAGCTGCTACGTGAA	79
Tm	59,18	60,67	
p21	GTTCTTGCCACTTCTTACCT	TCATCCTAGCTGGCCTTAGA	109
Tm	57,86	57,22	
p53	CCTCTCCCCGCAAAGAAA	GGCCCCACTTTCTTGACCAT	229 et 325 (Plusieurs transcripts)
Tm	60.25	60.25	
IL-1β	CTGGTACATCAGCACCTCACA	GAGCTCCTTAACATGCCCTG	155
Tm	59.72	58.33	

ANNEXE B

Profil de migration des amplicons sur gel d'agarose (après qPCR)

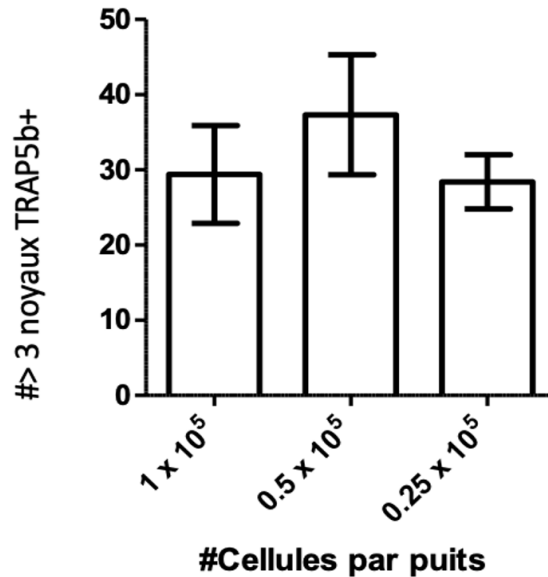


Légende : Après la réaction PCR, les amplicons ont été déposés sur gel d'agarose à 2% afin d'évaluer leur profil et de confirmer la spécificité d'amplification (en plus de l'analyse de la courbe de fusion). Pour chaque amplicon, les conditions suivantes ont été réalisées : 1-2 : amorces + ADN CT, 3-4 : amorces + ADN HE, 5-6 : amorces + ADN RANKL, 7-8 : amorces + ADN RANKL + HE, 9-10 : amorces + ADN H₂O₂, 10-12 : amorces + eau (Marqueur poids moléculaire : 100pb).

ANNEXE C

Génération d'ostéoclastes en présence de SL929 + RANKL à partir de macrophages différenciés.

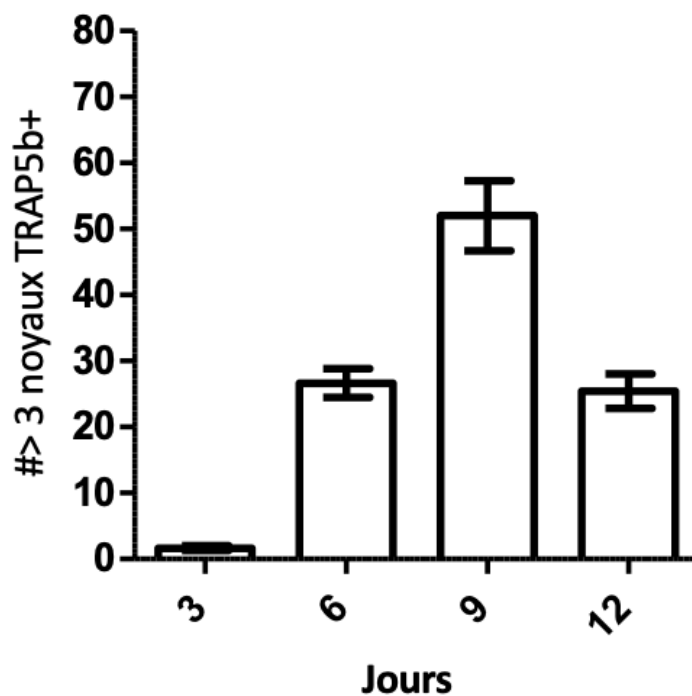
Macrophages préétablis (SL929 + RANKL)



Légende : Les cellules non adhérentes de la moelle osseuse (souris BALB/c) ont été mises en culture à différentes concentrations cellulaires dans du DMEMc supplémenté de 15% de SL929 durant 6 jours afin de générer des macrophages différenciés. Par la suite du jour 6 au jour 12, les macrophages ont soit été conditionnés avec du SL929 + RANKL ou RANKL seul. Au jour 12, les cellules ont été fixées à la PFA et marquées pour l'acide phosphatase tartrate résistante (TRAP5b). Est représenté le nombre d'OSCLs mature comptés pour la condition SL929 + RANKL (aucun OSCL n'a été formé en présence de RANKL seul).

ANNEXE D

Cinétique de formation des ostéoclastes matures en présence de RANKL + SL929 durant 12 Jours.



Légende : Les cellules non adhérentes de la moelle osseuse (souris BALB/c) ont été mises en culture avec du SL929 et RANKL durant 12 jours afin de générer des OSCLs matures. Aux 3 jours, les cellules ont été fixées à la PFA et marquées pour l'acide phosphatase tartrate résistante (TRAP5b). Est représenté le nombre d'OSCLs matures comptés aux différents jours. Le jour 9 est le jour où le plus d'OSCLs est formé.

BIBLIOGRAPHIE

- Al-Dujaili, Saja A., Esther Lau, Hashem Al-Dujaili, Kyle Tsang, Axel Guenther, et Lidan You. « Apoptotic Osteocytes Regulate Osteoclast Precursor Recruitment and Differentiation in Vitro ». *Journal of Cellular Biochemistry* 112, no 9 (septembre 2011): 2412-23. <https://doi.org/10.1002/jcb.23164>.
- Amarasekara, D. S., Yun, H., Kim, S., Lee, N., Kim, H., & Rho, J. (2018). Regulation of Osteoclast Differentiation by Cytokine Networks. *Immune Network*, 18(1), e8. <https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e8>
- Anselmino, Nicolás, Michael Starbuck, Estefania Labanca, Javier Cotignola, Nora Navone, Geraldine Gueron, Ana C. Zenclussen, et Elba Vazquez. « Heme Oxygenase-1 Is a Pivotal Modulator of Bone Turnover and Remodeling: Molecular Implications for Prostate Cancer Bone Metastasis ». *Antioxidants & Redox Signaling* 32, no 17 (10 juin 2020): 1243-58. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7879>.
- Bak, Sun-Uk, Suji Kim, Hae-Jun Hwang, Jung-A Yun, Wan-Sung Kim, Moo-Ho Won, Ji-Yoon Kim, Kwon-Soo Ha, Young-Guen Kwon, et Young-Myeong Kim. « Heme Oxygenase-1 (HO-1)/Carbon Monoxide (CO) Axis Suppresses RANKL-Induced Osteoclastic Differentiation by Inhibiting Redox-Sensitive NF- κ B Activation ». *BMB Reports* 50, no2 (28 février 2017): 103-8. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2017.50.2.220>.
- Baldanzi, Gabriel, Fabiola Traina, João Francisco Marques Neto, Allan Oliveira Santos, Celso Dario Ramos, et Sara T Olalla Saad. « Low Bone Mass Density Is Associated with Hemolysis in Brazilian Patients with Sickle Cell Disease ». *Clinics* 66, no 5 (2011): 801-5. <https://doi.org/10.1590/S1807-59322011000500015>.
- Blank, Martha, et Natalie A. Sims. « Cellular Processes by Which Osteoblasts and Osteocytes Control Bone Mineral Deposition and Maturation Revealed by Stage-Specific EphrinB2 Knockdown ». *Current Osteoporosis Reports* 17, no 5 (octobre 2019): 270-80. <https://doi.org/10.1007/s11914-019-00524-y>.
- Boskey, Adele L. « Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects ». *BoneKey Reports* 2 (4 décembre 2013). <https://doi.org/10.1038/bonekey.2013.181>.
- Boyce, B.F. « Advances in the Regulation of Osteoclasts and Osteoclast Functions ». *Journal of Dental Research* 92, no 10 (octobre 2013): 860-67. <https://doi.org/10.1177/0022034513500306>.
- Bozza, Marcelo T., et Viktória Jeney. « Pro-inflammatory Actions of Heme and Other Hemoglobin- Derived DAMPs ». *Frontiers in Immunology* 11 (30 juin 2020): 1323. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01323>.
- Brito Monteiro, L., Davanzo, G. G., de Aguiar, C. F., Corrêa da Silva, F., Andrade, J. R. de, Campos Codo, A., Silva Pereira, J. A. da, Freitas, L. P. de, & Moraes-Vieira, P. M. (2020). M-CSF- and L929SL929-derived macrophages present distinct metabolic profiles with similar inflammatory outcomes. *Immunobiology*, 225(3), 151935. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2020.151935>

- Brouard, S., Otterbein, L. E., Anrather, J., Tobiasch, E., Bach, F. H., Choi, A. M., & Soares, M. P. (2000). Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *The Journal of experimental medicine*, 192(7), 1015–1026. <https://doi.org/10.1084/jem.192.7.1015>
- Brown, Justin L., Sangamesh G. Kumbar, et Cato T. Laurencin. « Bone Tissue Engineering ». In *Biomaterials Science*, 1194-1214. Elsevier, 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00113-3>.
- Bruzzaniti, Angela, et Roland Baron. « Molecular Regulation of Osteoclast Activity ». *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 7, no 1-2 (3 janvier 2007): 123-39. <https://doi.org/10.1007/s11154-006-9009-x>.
- Callaway, Danielle A., et Jean X. Jiang. « Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in Osteoclastogenesis, Skeletal Aging and Bone Diseases ». *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 33, no 4 (juillet 2015): 359-70. <https://doi.org/10.1007/s00774-015-0656-4>.
- Chen, W., Yang, S., Abe, Y., Li, M., Wang, Y., Shao, J., Li, E., & Li, Y.-P. (2007). Novel pycnodysostosis mouse model uncovers cathepsin K function as a potential regulator of osteoclast apoptosis and senescence. *Human Molecular Genetics*, 16(4), 410-423. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl474>
- Chen, Xiao, Zhongqiu Wang, Na Duan, Guoying Zhu, Edward M. Schwarz, et Chao Xie. « Osteoblast–Osteoclast Interactions ». *Connective Tissue Research* 59, no 2 (4 mars 2018): 99-107. <https://doi.org/10.1080/03008207.2017.1290085>.
- Chen, Y., Fu, W.-L., Gan, X.-D., Xing, W.-W., Xia, W.-R., Zou, M.-J., Liu, Q., Wang, Y.-Y., Zhang, C., & Xu, D.-G. (2018). SAK-HV Promotes RAW264.7 cells Migration Mediated by MCP-1 via JNK and NF-κB Pathways. *International Journal of Biological Sciences*, 14(14), 1993-2002. <https://doi.org/10.7150/ijbs.27459>
- Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., & Campisi, J. (2010). The Senescence-Associated Secretory Phenotype : The Dark Side of Tumor Suppression. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 5(1), 99-118. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144>
- Davey, R. A., Clarke, M. V., Golub, S. B., Russell, P. K., & Zajac, J. D. (2021). The calcitonin receptor regulates osteocyte lacunae acidity during lactation in mice. *Journal of Endocrinology*, 249(1), 31-41. <https://doi.org/10.1530/JOE-20-0599>
- De Brito Monteiro, L., Davanzo, G. G., de Aguiar, C. F., Corrêa da Silva, F., Andrade, J. R. de, Campos Codo, A., Silva Pereira, J. A. da, Freitas, L. P. de, & Moraes-Vieira, P. M. (2020). M-CSF- and L929-derived macrophages present distinct metabolic profiles with similar inflammatory outcomes. *Immunobiology*, 225(3), 151935. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2020.151935>
- Dhaliwal G, Cornett PA, Tierney LM Jr. Hemolytic anemia. *Am Fam Physician*. 2004 Jun;69(11):2599-606. PMID: 15202694. *of Biological Chemistry* 282, no 28 (juillet 2007): 20221-29. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610737200>.
- Elder, Sonia S., et Elaine Emmerson. « Senescent Cells and Macrophages: Key Players for Regeneration? ». *Open Biology* 10, no 12 (décembre 2020): 200309. <https://doi.org/10.1098/rsob.200309>.

- Even, Benjamin, Sarah Fayad-Kobeissi, Jean-Marie Gagliolo, Roberto Motterlini, Jorge Boczkowski, Roberta Foresti, et Maylis Dagouassat. « Heme Oxygenase-1 Induction Attenuates Sénescence in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Lung Fibroblasts by Protecting against Mitochondria Dysfunction: XXXX ». *Aging Cell* 17, no 6 (décembre 2018): e12837. <https://doi.org/10.1111/acer.12837>.
- Everts, V., J. M. Delaissé, W. Korper, D. C. Jansen, W. Tigchelaar-Gutter, P. Saftig, et W. Beertsen. « The Bone Lining Cell: Its Role in Cleaning Howship's Lacunae and Initiating Bone Formation ». *Journal of Bone and Mineral Research* 17, no 1 (1 janvier 2002): 77-90. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.1.77>.
- Farr, Joshua N, Daniel G Fraser, Haitao Wang, Katharina Jaehn, Mikolaj B Ogradnik, Megan M Weivoda, Matthew T Drake, et al. « Identification of Senescent Cells in the Bone Microenvironment: SÉNESENCE IN THE BONE MICROENVIRONMENT ». *Journal of Bone and Mineral Research* 31, no 11 (novembre 2016): 1920-29. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2892>.
- Farr, Joshua N, Ming Xu, Megan M Weivoda, David G Monroe, Daniel G Fraser, Jennifer L Onken, Brittany A Negley, et al. « Targeting Cellular Sénescence Prevents Age-Related Bone Loss in Mice ». *Nature Medicine* 23, no 9 (1 septembre 2017): 1072-79. <https://doi.org/10.1038/nm.4385>.
- Ferreira, Ana, József Balla, Viktória Jeney, György Balla, et Miguel P. Soares. « A Central Role for Free Heme in the Pathogenesis of Severe Malaria: The Missing Link? ». *Journal of Molecular Medicine* 86, no 10 (octobre 2008): 1097-1111. <https://doi.org/10.1007/s00109-008-0368-5>.
- Figueiredo, Rodrigo T., Patricia L. Fernandez, Diego S. Mourao-Sa, Bárbara N. Porto, Fabianno F. Dutra, Letícia S. Alves, Marcus F. Oliveira, Pedro L. Oliveira, Aurélio V. Graça-Souza, et Marcelo T. Bozza. « Characterization of Heme as Activator of Toll-like Receptor 4 ». *Journal*
- Florencio-Silva, Rinaldo, Gisela Rodrigues da Silva Sasso, Estela Sasso-Cerri, Manuel Jesus Simões, et Paulo Sérgio Cerri. « Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells ». *BioMed Research International* 2015 (2015): 1-17. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>.
- Rodier, F., & Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *Journal of Cell Biology*, 192(4), 547-556. <https://doi.org/10.1083/jcb.201009094>
- Ghayor, C., Corroero, R. M., Lange, K., Karfeld-Sulzer, L. S., Grätz, K. W., & Weber, F. E. (2011). Inhibition of Osteoclast Differentiation and Bone Resorption by N-Methylpyrrolidone. *Journal of Biological Chemistry*, 286(27), 24458-24466. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.223297>
- Gorissen, B., De Bruin, A., Miranda - Bedate, A., Korthagen, N., Wolschrijn, C., De Vries, T. J., Van Weeren, R., & Tryfonidou, M. A. (2019). Hypoxia negatively affects sénescence in osteoclasts and delays osteoclastogenesis. *Journal of Cellular Physiology*, 234(1), 414-426. <https://doi.org/10.1002/jcp.26511>
- Gorissen, Ben, Alain de Bruin, Alberto Miranda - Bedate, Nicoline Korthagen, Claudia Wolschrijn, Teun J. de Vries, René van Weeren, et Marianna A. Tryfonidou. « Hypoxia Negatively Affects Sénescence in Osteoclasts and Delays Osteoclastogenesis ». *Journal of Cellular Physiology* 234, no 1 (janvier 2019): 414-26. <https://doi.org/10.1002/jcp.26511>.

- Gouveia, Z., Carlos, A. R., Yuan, X., Aires-da-Silva, F., Stocker, R., Maghzal, G. J., Leal, S. S., Gomes, C. M., Todorovic, S., Iranzo, O., Ramos, S., Santos, A. C., Hamza, I., Gonçalves, J., & Soares, M. P. (2017). Characterization of plasma labile heme in hemolytic conditions. *The FEBS Journal*, 284(19), 3278-3301. <https://doi.org/10.1111/febs.14192>
- Gozzelino, Raffaella, Viktoria Jeney, et Miguel P. Soares. « Mechanisms of Cell Protection by Heme Oxygenase-1 ». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 50, no 1 (1 février 2010): 323-54. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105600>.
- Gurevitch, Olga, et Shimon Slavin. « The Hematological Etiology of Osteoporosis ». *Medical Hypotheses* 67, no 4 (janvier 2006): 729-35. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2006.03.051>.
- Hama, Maasa, Yohei Kirino, Mitsuhiro Takeno, Kaoru Takase, Takuya Miyazaki, Ryusuke Yoshimi, Atsuhisa Ueda, et al. « Bach1 Regulates Osteoclastogenesis in a Mouse Model via Both Heme Oxygenase 1-Dependent and Heme Oxygenase 1-Independent Pathways ». *Arthritis & Rheumatism* 64, no 5 (mai 2012): 1518-28. <https://doi.org/10.1002/art.33497>.
- He, Y.-Q., Zhang, Q., Shen, Y., Han, T., Zhang, Q.-L., Zhang, J.-H., Lin, B., Song, H.-T., Hsu, H.-Y., Qin, L.-P., Xin, H.-L., & Zhang, Q.-Y. (2018). Rubiadin-1-methyl ether from *Morinda officinalis* How. Inhibits osteoclastogenesis through blocking RANKL-induced NF- κ B pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 506(4), 927-931. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.10.100>
- Heap, R. E., Marín-Rubio, J. L., Peltier, J., Heunis, T., Dannoura, A., Moore, A., & Trost, M. (2021). Proteomics characterisation of the L929SL929 cell supernatant and its role in BMDM differentiation. *Life Science Alliance*, 4(6), e202000957. <https://doi.org/10.26508/lsa.202000957>
- Higuchi, S., Miyamoto, T., Kobara, H., Yamada, S., Asaka, R., Kikuchi, N., Kashima, H., Ohira, S., & Shiozawa, T. (2019). Trophoblast type-specific expression of senescence markers in the human placenta. *Placenta*, 85, 56-62. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2019.06.377>
- Hobolt-Pedersen, Anne-Sofie, Jean-Marie Delaissé, et Kent Sjøe. « Osteoclast Fusion Is Based on Heterogeneity Between Fusion Partners ». *Calcified Tissue International* 95, no 1 (juillet 2014): 73-82. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9864-5>.
- Houschyar, Khosrow S., Christian Tapking, Mimi R. Borrelli, Daniel Popp, Dominik Duscher, Zeshaan N. Maan, Malcolm P. Chelliah, et al. « Wnt Pathway in Bone Repair and Regeneration – What Do We Know So Far ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 6 (7 janvier 2019): 170. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00170>.
- Ishii, Masaru, Jackson G. Egen, Frederick Klauschen, Martin Meier-Schellersheim, Yukihiro Saeki, Jean Vacher, Richard L. Proia, et Ronald N. Germain. « Sphingosine-1-Phosphate Mobilizes Osteoclast Precursors and Regulates Bone Homeostasis ». *Nature* 458, no 7237 (26 mars 2009): 524-28. <https://doi.org/10.1038/nature07713>.
- Jansen, I. D. C., Vermeer, J. A. F., Bloemen, V., Stap, J., & Everts, V. (2012). Osteoclast Fusion and Fission. *Calcified Tissue International*, 90(6), 515-522. <https://doi.org/10.1007/s00223-012-9600-y>
- Jeney, V. (2017). Clinical Impact and Cellular Mechanisms of Iron Overload-Associated Bone Loss. *Frontiers in Pharmacology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00077>

- Jiang, Z., Wang, H., Qi, G., Jiang, C., Chen, K., & Yan, Z. (2022). Iron overload-induced ferroptosis of osteoblasts inhibits osteogenesis and promotes osteoporosis : An in vitro and in vivo study. *IUBMB Life*, 74(11), 1052-1069. <https://doi.org/10.1002/iub.2656>
- Juan, Celia Andrés, José Manuel Pérez de la Lastra, Francisco J. Plou, et Eduardo Pérez-Lebeña. « The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies ». *International Journal of Molecular Sciences* 22, no 9 (28 avril 2021): 4642. <https://doi.org/10.3390/ijms22094642>.
- Katsimbri, P. « The Biology of Normal Bone Remodelling ». *European Journal of Cancer Care* 26, no 6 (novembre 2017): e12740. <https://doi.org/10.1111/ecc.12740>.
- Kim, Ha-Neui, Jianhui Chang, Srividhya Iyer, Li Han, Judith Campisi, Stavros C. Manolagas, Daohong Zhou, et Maria Almeida. « Elimination of Senescent Osteoclast Progenitors Has No Effect on the Age-associated Loss of Bone Mass in Mice ». *Aging Cell* 18, no 3 (juin 2019). <https://doi.org/10.1111/acer.12923>.
- Kodagoda Gamage, S. M., Cheng, T., Lee, K. T.-W., Dissabandara, L., Lam, A. K.-Y., & Gopalan, V. (2021). Hemin, a major heme molecule, induced cellular and genetic alterations in normal colonic and colon cancer cells. *Pathology - Research and Practice*, 224, 153530. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2021.153530>
- Komori, Toshihisa. « Regulation of Osteoblast Differentiation by Runx2 ». In *Osteoimmunology*, édité par Yongwon Choi, 658:43-49. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Boston, MA: Springer US, 2009. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1050-9_5.
- Lampiasi, N., Russo, R., Kireev, I., Strelkova, O., Zhironkina, O., & Zito, F. (2021). Osteoclasts Differentiation from Murine RAW 264.7 Cells Stimulated by RANKL : Timing and Behavior. *Biology*, 10(2), 117. <https://doi.org/10.3390/biology10020117>
- Ledesma-Colunga, M. G., Weidner, H., Vujic Spasic, M., Hofbauer, L. C., Baschant, U., & Rauner, M. (2021). Shaping the bone through iron and iron-related proteins. *Seminars in Hematology*, 58(3), 188-200. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2021.06.002>
- Lee, Na Kyung, Young Geum Choi, Ji Youn Baik, Song Yi Han, Dae-won Jeong, Yun Soo Bae, Nacksung Kim, et Soo Young Lee. « A Crucial Role for Reactive Oxygen Species in RANKL-Induced Osteoclast Differentiation ». *Blood* 106, no 3 (1 août 2005): 852-59. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3662>.
- Lee, S. Y., Park, K. H., Lee, G., Kim, S.-J., Song, W.-H., Kwon, S.-H., Koh, J.-T., Huh, Y. H., & Ryu, J.-H. (2021). Hypoxia-inducible factor-2 α mediates senescence-associated intrinsic mechanisms of age-related bone loss. *Experimental & Molecular Medicine*, 53(4), 591-604. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00594-y>
- Luo, Jian, Zhengfeng Yang, Yu Ma, Zhiying Yue, Hongyu Lin, Guojun Qu, Jinping Huang, et al. « LGR4 Is a Receptor for RANKL and Negatively Regulates Osteoclast Differentiation and Bone Resorption ». *Nature Medicine* 22, no 5 (mai 2016): 539-46. <https://doi.org/10.1038/nm.4076>.

- Luo, Wenwei, Jingyan Li, Ziqing Li, Tong Lin, Lili Zhang, Wanqi Yang, Yanqi Mai, et al. « HO-1 Nuclear Accumulation and Interaction with NPM1 Protect against Stress-Induced Endothelial Senescence Independent of Its Enzymatic Activity ». *Cell Death & Disease* 12, no 8 (août 2021): 738. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04035-6>.
- Ma, Y., Shi, X., Zhao, H., Song, R., Zou, H., Zhu, J., & Liu, Z. (2022). Potential mechanisms of osteoprotegerin-induced damage to osteoclast adhesion structures via P2X7R-mediated MAPK signaling. *International Journal of Molecular Medicine*, 49(5), 59. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2022.5115>
- Madel, Maria-Bernadette, Lidia Ibáñez, Matthieu Rouleau, Abdelilah Wakkach, et Claudine Blin-Wakkach. « A Novel Reliable and Efficient Procedure for Purification of Mature Osteoclasts Allowing Functional Assays in Mouse Cells ». *Frontiers in Immunology* 9 (2 novembre 2018): 2567. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02567>.
- Marahleh, A., Kitaura, H., Otori, F., Kishikawa, A., Ogawa, S., Shen, W.-R., Qi, J., Noguchi, T., Nara, Y., & Mizoguchi, I. (2019). TNF- α Directly Enhances Osteocyte RANKL Expression and Promotes Osteoclast Formation. *Frontiers in Immunology*, 10, 2925. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02925>
- Maria, Salwa M., Christiane Prukner, Zeeshan Sheikh, Frank Mueller, Jake. E. Barralet, et Svetlana V. Komarova. « Reproducible Quantification of Osteoclastic Activity: Characterization of a Biomimetic Calcium Phosphate Assay: Osteoclast Resorption Assay On Biomimetic Hydroxyapatite ». *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 102, no 5 (juillet 2014): 903-12. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33071>.
- Mentaverri, R., S. Yano, N. Chattopadhyay, L. Petit, O. Kifor, S. Kamel, E. F. Terwilliger, et al. « The Calcium Sensing Receptor Is Directly Involved in Both Osteoclast Differentiation and Apoptosis ». *The FASEB Journal* 20, no 14 (décembre 2006): 2562-64. <https://doi.org/10.1096/fj.06-6304fje>.
- Meshcheryakova, A., Mechtcheriakova, D., & Pietschmann, P. (2017). Sphingosine 1-phosphate signaling in bone remodeling : Multifaceted roles and therapeutic potential. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 21(7), 725-737. <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1332180>
- Mice ». Édité par Valery Combes. *PLoS ONE* 7, no 9 (28 septembre 2012): e46101. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046101>.
- Mijit, M., Caracciolo, V., Melillo, A., Amicarelli, F., & Giordano, A. (2020). Role of p53 in the Regulation of Cellular Senescence. *Biomolecules*, 10(3), 420. <https://doi.org/10.3390/biom10030420>
- Møller, Anaïs Marie Julie, Jean-Marie Delaissé, et Kent Sjøe. « Osteoclast Fusion: Time-Lapse Reveals Involvement of CD47 and Syncytin-1 at Different Stages of Nuclearity: CD47 AND SYNCYTIN-1: DIFFERENT ROLES IN FUSION ». *Journal of Cellular Physiology* 232, no 6 (juin 2017): 1396-1403. <https://doi.org/10.1002/jcp.25633>.
- Moreau, Robert, Diane Tshikudi Malu, Mathieu Dumais, Esther Dalko, Véronique Gaudreault, Hugo Roméro, Corine Martineau, et al. « Alterations in Bone and Erythropoiesis in Hemolytic Anemia: Comparative Study in Bled, Phenylhydrazine-Treated and Plasmodium-Infected

- Moriishi, Takeshi, Ryo Fukuyama, Masako Ito, Toshihiro Miyazaki, Takafumi Maeno, Yosuke Kawai, Hisato Komori, et Toshihisa Komori. « Osteocyte Network; a Negative Regulatory System for Bone Mass Augmented by the Induction of Rankl in Osteoblasts and Sost in Osteocytes at Unloading ». Édité par Vladimir V. Kalinichenko. PLoS ONE 7, no 6 (29 juin 2012): e40143. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040143>.
- Morisawa, Takeshi, Ronald J. Wong, Vinod K. Bhutani, Hendrik J. Vreman, et David K. Stevenson. « Inhibition of Heme Oxygenase Activity in Newborn Mice by Azalanstat ». Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 86, no 10 (octobre 2008): 651-59. <https://doi.org/10.1139/Y08-069>.
- Morse, D., Lin, L., Choi, A. M. K., & Ryter, S. W. (2009). Heme oxygenase-1, a critical arbitrator of cell death pathways in lung injury and disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.04.007>.
- Napier, Brooke, et Denise Monack. « Creating a RAW264.7 CRISPR-Cas9 Genome Wide Library ». BIO-PROTOCOL 7, no 10 (2017). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2320>.
- Naryzny, S. N., et O. K. Legina. « Haptoglobin as a Biomarker ». Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry 15, no 3 (juillet 2021): 184-98. <https://doi.org/10.1134/S1990750821030069>.
- Niekerk, Gustav van, Megan Mitchell, et Anna-Mart Engelbrecht. « Bone Resorption: Supporting Immunometabolism ». Biology Letters 14, no 2 (février 2018): 20170783. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2017.0783>.
- Osteoporosis ». Frontiers in Cell and Developmental Biology 9 (30 novembre 2021): 791585. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.791585>.
- Parfenova, Helena, and Charles W Leffler. "Cerebroprotective functions of HO-2." pharmaceutical design Current vol. 14,5 (2008): 443-53. doi:10.2174/138161208783597380
- Pereira, M., Petretto, E., Gordon, S., Bassett, J. H. D., Williams, G. R., & Behmoaras, J. (2018). Common signalling pathways in macrophage and osteoclast multinucleation. *Journal of Cell Science*, 131(11), jcs216267. <https://doi.org/10.1242/jcs.216267>
- Peruzzi, Barbara, et Anna Teti. « The Physiology and Pathophysiology of the Osteoclast ». Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism 10, no 2 (juin 2012): 71-97. <https://doi.org/10.1007/s12018-011-9086-6>.
- Pignolo, R. J., Law, S. F., & Chandra, A. (2021). Bone Aging, Cellular Sénescence, and Osteoporosis. *JBMR Plus*, 5(4). <https://doi.org/10.1002/jbm4.10488>
- Pignolo, Robert J, Susan F Law, et Abhishek Chandra. « Bone Aging, Cellular Sénescence, and Osteoporosis ». *JBMR Plus* 5, no 4 (avril 2021). <https://doi.org/10.1002/jbm4.10488>.
- Piper, Kim, Alan Boyde, et SheilaJ. Jones. « The Relationship between the Number of Nuclei of an Osteoclast and Its Resorptive Capability in Vitro ». *Anatomy and Embryology* 186, no 4 (septembre 1992). <https://doi.org/10.1007/BF00185977>.

- Piriyakhuntorn, Pokpong, Adisak Tantiworawit, Mattabhorn Phimphilai, Krekwit Shinlapawittayatorn, Siriporn C. Chattipakorn, et Nipon Chattipakorn. « Impact of Iron Overload on Bone Remodeling in Thalassemia ». *Archives of Osteoporosis* 15, no 1 (décembre 2020): 143. <https://doi.org/10.1007/s11657-020-00819-z>.
- Pixley, F. J. (2012). Macrophage Migration and Its Regulation by CSF-1. *International Journal of Cell Biology*, 2012, 1 12. <https://doi.org/10.1155/2012/501962>
- Pradhan, Pooja, Vijith Vijayan, Faikah Gueler, et Stephan Immenschuh. « Interplay of Heme with Macrophages in Homeostasis and Inflammation ». *International Journal of Molecular Sciences* 21, no 3 (23 janvier 2020): 740. <https://doi.org/10.3390/ijms21030740>.
- Rachner, T. D., Khosla, S., & Hofbauer, L. C. (2011). Osteoporosis : Now and the future. *The Lancet*, 377(9773), 1276 1287. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62349-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62349-5)
- Renema, Nathalie, Benjamin Navet, Marie-Françoise Heymann, Frédéric Lezot, et Dominique Heymann. « RANK–RANKL Signalling in Cancer ». *Bioscience Reports* 36, no 4 (1 août 2016): e00366. <https://doi.org/10.1042/BSR20160150>.
- Rosenberg, Nahum, Orit Rosenberg, et Michael Soudry. « Osteoblasts in Bone Physiology – Mini Review ». *Rambam Maimonides Medical Journal* 3, no 2 (29 avril 2012). <https://doi.org/10.5041/RMMJ.10080>.
- Rumpler, M., Würger, T., Roschger, P., Zwettler, E., Sturmlechner, I., Altmann, P., Fratzl, P., Rogers, M. J., & Klaushofer, K. (2013). Osteoclasts on Bone and Dentin In Vitro : Mechanism of Trail Formation and Comparison of Resorption Behavior. *Calcified Tissue International*, 93(6), 526 539. <https://doi.org/10.1007/s00223-013-9786-7>
- Rutkovskiy, Arkady, Kåre-Olav Stensløyken, et Ingvar Jarle Vaage. « Osteoblast Differentiation at a Glance ». *Medical Science Monitor Basic Research* 22 (26 septembre 2016): 95-106. <https://doi.org/10.12659/MSMBR.901142>.
- Sadat-Ali, Mir, Osama Sultan, Haifa Al-Turki, et Abdulmohsen AlElq. « Does High Serum Iron Level Induce Low Bone Mass in Sickle Cell Anemia ? ». *BioMetals* 24, no 1 (février 2011): 19-22. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9391-4>.
- Sakai, Eiko, Megumi Shimada-Sugawara, Kazuhisa Nishishita, Yutaka Fukuma, Mariko Naito, Kuniaki Okamoto, Koji Nakayama, et Takayuki Tsukuba. « Suppression of RANKL- Dependent Heme Oxygenase-1 Is Required for High Mobility Group Box 1 Release and Osteoclastogenesis ». *Journal of Cellular Biochemistry* 113, no 2 (février 2012): 486-98. <https://doi.org/10.1002/jcb.23372>.
- Salerno, Loredana, Valeria Pittalà, Giuseppe Romeo, Maria N. Modica, Agostino Marrazzo, Maria A. Siracusa, Valeria Sorrenti, et al. « Novel Imidazole Derivatives as Heme Oxygenase-1 (HO-1) and Heme Oxygenase-2 (HO-2) Inhibitors and Their Cytotoxic Activity in Human- Derived Cancer Cell Lines ». *European Journal of Medicinal Chemistry* 96 (mai 2015): 162-72. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.003>.

- Salhotra, Ankit, Harsh N. Shah, Benjamin Levi, et Michael T. Longaker. « Mechanisms of Bone Development and Repair ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21, no 11 (novembre 2020): 696-711. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00279-w>.
- Salminen, Antero, Anu Kauppinen, et Kai Kaarniranta. « Emerging Role of NF-KB Signaling in the Induction of Sénescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) ». *Cellular Signalling* 24, no 4 (avril 2012): 835-45. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.12.006>.
- Shi, L., Lin, C.-L., Su, C.-H., Lin, K.-C., Leong, K.-H., Wang, Y.-T. T., Kuo, C.-F., & Tsai, S.-Y. (2021). The Risk of Developing Osteoporosis in Hemolytic Anemia—What Aggravates the Bone Loss? *Journal of Clinical Medicine*, 10(15), 3364. <https://doi.org/10.3390/jcm10153364>
- Shih, Andrew W.Y., Andrew McFarlane, et Madeleine Verhovsek. « Haptoglobin Testing in Hemolysis: Measurement and Interpretation: Haptoglobin Testing in Hemolysis ». *American Journal of Hematology* 89, no 4 (avril 2014): 443-47. <https://doi.org/10.1002/ajh.23623>.
- Smith-Guzmán, Nicole E. « The Skeletal Manifestation of Malaria: An Epidemiological Approach Using Documented Skeletal Collections: The Skeletal Manifestation of Malaria ». *American Journal of Physical Anthropology* 158, no 4 (décembre 2015): 624-35. <https://doi.org/10.1002/ajpa.22819>.
- Sobacchi, C., Schulz, A., Coxon, F. P., Villa, A., & Helfrich, M. H. (2013). Osteopetrosis : Genetics, treatment and new insights into osteoclast function. *Nature Reviews Endocrinology*, 9(9), 522 536. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.137>
- Søe, Kent, et Jean-Marie Delaissé. « Time-Lapse Reveals That Osteoclasts Can Move across the Bone Surface While Resorbing ». *Journal of Cell Science*, 1 janvier 2017, jcs.202036. <https://doi.org/10.1242/jcs.202036>.
- Søe, Kent, Jean-Marie Delaisse, et Xenia Goldberg Borggaard. « Osteoclast Formation at the Bone Marrow/Bone Surface Interface: Importance of Structural Elements, Matrix, and Intercellular Communication ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 112 (avril 2020): 8-15. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.05.016>.
- Søe, Kent, Thomas Levin Andersen, Maja Hinge, Lars Rolighed, Niels Marcussen, et Jean-Marie Delaisse. « Coordination of Fusion and Trafficking of Pre-Osteoclasts at the Marrow–Bone Interface ». *Calcified Tissue International* 105, no 4 (octobre 2019): 430-45. <https://doi.org/10.1007/s00223-019-00575-4>.
- Søe, Kent. « Osteoclast Fusion: Physiological Regulation of Multinucleation through Heterogeneity—Potential Implications for Drug Sensitivity ». *International Journal of Molecular Sciences* 21, no 20 (19 octobre 2020): 7717. <https://doi.org/10.3390/ijms21207717>.
- Soyas, N. S., & Alles, N. (2019). Positive and negative regulators of osteoclast apoptosis. *Bone Reports*, 11, 100225. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2019.100225>
- Soyas, Niroshani Surangika, et Neil Alles. « Positive and Negative Regulators of Osteoclast Apoptosis ». *Bone Reports* 11 (décembre 2019): 100225. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2019.100225>.

- Sözen, T., Özişik, L., & Başaran, N. Ç. (2017). An overview and management of osteoporosis. *European Journal of Rheumatology*, 4(1), 46-56. <https://doi.org/10.5152/eurjrheum.2016.048>
- Spychalska, Justyna. (2012). Red blood cell membranopathies - Pathogenesis, clinical presentation and diagnosis. *Hematologia*. 3. 81-119.
- Stanley, E. R., & Chitu, V. (2014). CSF-1 Receptor Signaling in Myeloid Cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(6), a021857 a021857. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021857>
- Steer, Kieran, Mariya Stavnichuk, Martin Morris, et Svetlana V Komarova. « Bone Health in Patients With Hematopoietic Disorders of Bone Marrow Origin: Systematic Review and Meta- Analysis: BONE IN BLOOD DISORDERS ». *Journal of Bone and Mineral Research* 32, no 4 (avril 2017): 731-42. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3026>.
- Stubelius, Alexandra, Annica Andersson, Rikard Holmdahl, Claes Ohlsson, Ulrika Islander, et Hans Carlsten. « Ncf1 Affects Osteoclast Formation but Is Not Critical for Postmenopausal Bone Loss ». *BMC Musculoskeletal Disorders* 17, no 1 (décembre 2016): 464. <https://doi.org/10.1186/s12891-016-1315-1>.
- Sun, L., Lian, J. X., & Meng, S. (2019). MiR-125a-5p promotes osteoclastogenesis by targeting TNFRSF1B. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 24(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s11658-019-0146-0>
- Taciak, B., Białasek, M., Braniewska, A., Sas, Z., Sawicka, P., Kiraga, Ł., Rygiel, T., & Król, M. (2018). Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. *PLOS ONE*, 13(6), e0198943. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198943> (gène de référence RT-qPCR Eef2 chez les RAW 264.7).
- Taher, Ali T., et Antoine N. Saliba. « Iron Overload in Thalassemia: Different Organs at Different Rates ». *Hematology* 2017, no 1 (8 décembre 2017): 265-71. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2017.1.265>
- Takami, M., Kim, N., Rho, J., & Choi, Y. (2002). Stimulation by toll-like receptors inhibits osteoclast differentiation. *The Journal of Immunology*, 169(3), 1516-1523.
- Thuy, Andreas V., Christina-Maria Reimann, Nasr Y. A. Hemdan, et Markus H. Gräler. « Sphingosine 1-Phosphate in Blood: Function, Metabolism, and Fate ». *Cellular Physiology and Biochemistry* 34, no 1 (2014): 158-71. <https://doi.org/10.1159/000362992>.
- Tong, L., Wang, Y., Wang, J., He, F., Zhai, J., Bai, J., & Zhu, G. (2020). Radiation alters osteoclastogenesis by regulating the cytoskeleton and lytic enzymes in RAW 264.7 cells and mouse bone marrow-derived macrophages. *International Journal of Radiation Biology*, 96(10), 1296 1308. <https://doi.org/10.1080/09553002.2020.1798542>
- Voskaridou, Ersi, et Evangelos Terpos. « New Insights into the Pathophysiology and Management of Osteoporosis in Patients with Beta Thalassemia: Review ». *British Journal of Haematology* 127, no 2 (octobre 2004): 127-39. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.05143.x>.

- Wang, G., Hamid, T., Keith, R. J., Zhou, G., Partridge, C. R., Xiang, X., ... & Prabhu, S. D. (2010). Cardioprotective and antiapoptotic effects of heme oxygenase-1 in the failing heart. *Circulation*, 121(17), 1912-1925.
- Watahiki, A., Hoshikawa, S., Chiba, M., Egusa, H., Fukumoto, S., & Inuzuka, H. (2021). Deficiency of Lipin2 Results in Enhanced NF- κ B Signaling and Osteoclast Formation in RAW-D Murine Macrophages. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 2893. <https://doi.org/10.3390/ijms22062893>
- Wu, Bing, Yanwei Wu, et Wei Tang. « Heme Catabolic Pathway in Inflammation and Immune Disorders ». *Frontiers in Pharmacology* 10 (24 juillet 2019): 825. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00825>.
- Wu, Xiaojun, Margaret A. McKenna, Xu Feng, Tim R. Nagy, et Jay M. McDonald. « Osteoclast Apoptosis: The Role of Fas in Vivo and in Vitro ». *Endocrinology* 144, no 12 (décembre 2003): 5545-55. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0296>.
- Yang, D.-H., & Yang, M.-Y. (2019). The Role of Macrophage in the Pathogenesis of Osteoporosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2093. <https://doi.org/10.3390/ijms20092093>
- Zach, Frank, Alexandra Mueller, et André Gessner. « Production and Functional Characterization of Murine Osteoclasts Differentiated from ER-Hoxb8-Immortalized Myeloid Progenitor Cells ». Édité par Dominique Heymann. *PLOS ONE* 10, no 11 (3 novembre 2015): e0142211. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142211>.
- Zanchetta, M. B., Boailchuk, J., Massari, F., Silveira, F., Bogado, C., & Zanchetta, J. R. (2018). Significant bone loss after stopping long-term denosumab treatment: a post FREEDOM study. *Osteoporosis International*, 29, 41-47
- Zhang, Y., Polman, M., Mohammad, A. F., Hermens, I., Zhuang, Z., Wang, H., & van den Beucken, J. JJP. (2022). Species-independent stimulation of osteogenic differentiation induced by osteoclasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 606, 149-155. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.03.115>
- Zhong, Hui, et Karina Yazdanbakhsh. « Hemolysis and Immune Regulation »: *Current Opinion in Hematology* 25, no 3 (mai 2018): 177-82. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000423>.
- Zhou, Xueman, Wenxiu Yuan, Xin Xiong, Zhenzhen Zhang, Jiaqi Liu, Yingcheng Zheng, Jun Wang, et Jin Liu. « HO-1 in Bone Biology: Potential Therapeutic Strategies for
- Zhu, Mingsheng, Ping Meng, Xian Ling, et Lili Zhou. « Advancements in Therapeutic Drugs Targeting of Senescence ». *Therapeutic Advances in Chronic Disease* 11 (janvier 2020): 204062232096412. <https://doi.org/10.1177/2040622320964125>.
- Zwerina, Jochen, Sotiria Tzima, Silvia Hayer, Kurt Redlich, Oskar Hoffmann, Beatrice Hanslik-Schnabel, Josef S. Smolen, George Kollias, et Georg Schett. « Heme Oxygenase 1 (HO-1) Regulates Osteoclastogenesis and Bone Resorption ». *The FASEB Journal* 19, no 14 (décembre 2005): 2011-13. <https://doi.org/10.1096/fj.05-4278fje>.