

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

LA REGULATION DES CANAUX « TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL
VANILLOID » (TRPV) PAR LA PARATHORMONE (PTH) ET SON EFFET SUR
LES FONCTIONS OSTEOBLASTIQUES

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

MARINE REGNIER

AVRIL 2016

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.07-2011). 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 particulièrement à remercier mon directeur de recherche, mon mentor : Robert Moreau. Il m'a fait découvrir le monde de la recherche et m'a offert une formation qui n'a pas de prix. Je le remercie de m'avoir fait confiance en m'ouvrant son laboratoire ainsi que du temps et de la patience qu'il m'a consacré pour mener à bien mon projet. Sa porte nous était toujours ouverte et il savait trouver les mots justes pour nous motiver et nous pousser à nous dépasser. Je dois aussi beaucoup aux personnes avec qui j'ai partagé ce laboratoire durant ces cinq merveilleuses années : Céline, Jérôme, Véronique, Rachel, Corine, Olha, Abdallah et Hugo. Nous étions comme une deuxième famille qui partageait ses joies, ses énervements et ses frustrations face aux résultats que nous obtenions ou non, d'ailleurs ! Enfin, je remercie toute l'équipe des techniciens de l'UQÀM. Des personnes formidables, toujours à notre écoute et disponibles pour nous aider.

J'ai une pensée spéciale pour Tatiana Scorza, Louise Brissette et Catherine Jumarie qui ont été présentes dans une période difficile et qui m'ont permis de terminer ce mémoire.

Je remercie également ma maman, qui m'a toujours soutenu et encouragé quelque soit les projets que j'ai entrepris, mon cher amoureux ainsi que ma famille adoptive Québécoise : Capitaine et So sans qui je n'y serai pas arrivé. Enfin, je dis un gros merci à tous mes amis aussi bien Français que Québécois qui ont toujours été là pour moi lors de ce parcours académique qui fut quelque peu houleux.

J'ai failli oublier ! Je tiens aussi à souligner l'importance de mon chat : Chipie dont l'amour et les câlins m'ont réconforté plus d'une fois après une dure journée de laboratoire.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	V
LISTE DES TABLEAUX.....	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES.....	IX
RÉSUMÉ.....	XIII
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I.....	4
ÉTAT DES CONNAISSANCES	
1.1 L'ostéoporose.....	5
1.2 Le métabolisme osseux	6
1.2.1 Le tissu osseux	6
1.2.2 Les ostéoclastes et le processus de résorption osseuse	8
1.2.3 Les ostéoblastes et la formation osseuse	9
1.2.4 Les ostéocytes	10
1.2.5 Le remodelage osseux	10
1.2.6 La régulation du remodelage osseux.....	13
1.3 La parathormone et les voies de signalisation intracellulaire	16
1.4 Le calcium.....	19
1.5 Les résultats préliminaires du laboratoire	20
1.6 Les canaux « Transient Receptor Potential ».....	21
1.6.1 Généralités sur les différentes familles	21
1.6.2 Généralités sur les TRPV1	23
1.6.3 Rôle des canaux TRPV1 au niveau de l'os	25
1.6.4 Régulation de l'activité des TRPV1.....	27
1.6.5 AKAP79/150 et TRPV1	29

CHAPITRE II	30
HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	
CHAPITRE III.....	33
MÉTHODOLOGIE	
3.1 Culture cellulaire	33
3.2 Étude de l'expression génique par RT-PCR.....	34
3.3 Mesure de calcium intracellulaire.....	35
3.3.1 Technique de manipulation.....	35
3.3.2 Effets des différents traitements sur l'influx calcique	36
3.4 Migration cellulaire	38
3.5 Indice de prolifération par microtiter tetrazolium	38
3.6 Analyses statistiques	39
CHAPITRE IV	40
RÉSULTATS	
CHAPITRE V	56
DISCUSSION	
5.1 Signalisation de la PTH en lien avec l'influx calcique et la voie de signalisation associée à l'AMPC.....	57
5.2 Implication des canaux TRPV1 dans l'influx calcique stimulé par la PTH.....	59
5.3 Rôle de la PKA dans l'activation des canaux TRPV1 induit par la PTH.....	61
5.4 Modulation de la migration des ostéoblastes par la PTH <i>via</i> l'activation des canaux TRPV1	63
5.5 Régulation de la prolifération ostéoblastique par les canaux TRPV1 et la PTH65	
CHAPITRE VI	68
CONCLUSION	
BIBLIOGRAPHIE.....	71

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Structure d'un os long (humérus).	8
Figure 1.2	Les différentes étapes du remodelage osseux chez un individu sain.	13
Figure 1.3	Rôle de la calcitonine, de la parathormone et du calcitriol dans l'homéostasie du calcium.	15
Figure 1.4	Signalisation du récepteur PTH/PTHrP (PTH1R).	18
Figure 1.5	Effet de l'inhibiteur des canaux TRPV, le ruthénium red, sur l'influx calcique induit par la PTH.	21
Figure 1.6	La famille TRPV (vanilloïde).	23
Figure 1.7	Représentation schématique d'une sous-unité du canal TRPV1.	25
Figure 4.1	Expression génique des récepteurs de la PTH dans la lignée d'ostéoblastes humains U2OS.	42
Figure 4.2	La PTH se fixe au récepteur PTH1R et stimule un influx calcique dépendant de l'AMPC dans les cellules U2OS.	45
Figure 4.3	Activation des canaux TRPV par la PTH et la voie de signalisation associée à l'AMPC.	47
Figure 4.4	Expression génique des canaux TRPV1, TRPV2 et TRPV4 dans les cellules U2OS.	48
Figure 4.5	Activation des canaux TRPV1 par la PTH et la voie de signalisation associée à l'AMPC dans les cellules U2OS.	50
Figure 4.6	Implication de la PKA dans l'influx de calcium induit par la PTH.	51
Figure 4.7	Stimulation de la migration des cellules U2OS par la PTH et implication de la voie de signalisation associée à l'AMPC.	53
Figure 4.8	Stimulation de la prolifération des cellules U2OS <i>via</i> l'ouverture des canaux TRPV1 par la PTH et la voie de signalisation associée à l'AMPC.	55

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
3.1 Amorces utilisées pour les réactions PCR.	35

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

AC : adénylate cyclase

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

AKAP : « a-kinase anchor protein »

ALP : phosphatase alcaline

AMPC : adénosine 3' :5'-monophosphate cyclique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATP : adénosine triphosphate

BMP : « bone morphogenetic protein »

BMU : unité multicellulaire de base

CaM : calmoduline

CAP : capsaïcine

CREB : « cAMP response element-binding protein »

DAG : diacylglycérol

DMSO : diméthylsulfoxyde

FBS : sérum fœtal bovin

FOR : forskoline

GDP : guanosine 5'-diphosphate

GTP : guanosine 5'-triphosphate

x

HPRT : hypoxanthine phosphoribosyltransférase

IBMX : 3-isobutyl-1-methylxanthine

IGF : « insulin-like growth factor »

IKK β : ikappaB kinase β

IP3: inositol 1,4,5 triphosphate

M-CSF: « macrophage colony stimulating factor »

MTT : microtiter tetrazolium

NF- κ B : « nuclear factor-kappa b »

OPG : ostéoprotégérine

PCR : réaction polymérase en chaîne

PIP2 : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PKA : protéine kinase A

PKC : protéine kinase C

PLC: phospholipase C

PP2B : protéine phosphatase 2B

PTH: hormone parathyroïdienne

PTHrP : « PTH related peptide »

RANK: « receptor activator of nuclear factor- κ B »

RANKL: « receptor activator of nuclear factor- κ B ligand »

RE : réticulum endoplasmique

RN : RN1734

RR : ruthénium red

RT : « reverse transcriptase » (transcriptase inverse)
RUNX2 : « runt-related transcription factor 2 »
SEM : écarts à la moyenne
SERCA : sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPases
TNF- α : « tumor necrosis factor α »
TGF- β : « transforming growth facteur β »
TRAN : tranilast
TRP : « transient receptor potential »
TRPC1-7 : « canonique transient receptor potential »
TRPM1-8 : « mélastatine transient receptor potential »
TRPML: « mucolipine transient receptor potential »
TRPA : « ankyrin transient receptor potential »
TRPP : « polycystine transient receptor potential »
TRPV : « vallinoid transient receptor potential »
TRPV1-6 : « vanilloïde transient receptor potential »
VDCC : « voltage-dependent calcium channel »

RÉSUMÉ

L'os est un tissu dynamique qui est en constant renouvellement grâce au partenariat entre les ostéoclastes et les ostéoblastes. Son renouvellement est assuré par le processus de remodelage qui repose sur l'équilibre entre deux phases : la résorption et la formation osseuse. La résorption est assurée par les ostéoclastes et consiste en la dégradation de la matrice minéralisée de l'os qui sera ensuite reformée par les ostéoblastes. Si un déséquilibre entre ces deux phases favorise la résorption, on observe le développement de l'ostéoporose. Il s'agit d'une maladie caractérisée par une diminution de la masse osseuse et une détérioration de la microarchitecture de l'os. Ces dix dernières années, des études ont suggéré que la parathormone (PTH), bien connue comme une hormone stimulant la résorption de l'os en cas d'hypocalcémie, peut également avoir un rôle anabolique au niveau de la formation osseuse. Toutefois, les mécanismes d'action de la PTH et sa signalisation intracellulaire ne sont pas totalement connus, ce qui limite le potentiel possible des traitements à base de PTH pour contrer l'ostéoporose. La signalisation des récepteurs PTH est généralement associée à la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et à un influx de calcium qui agissent comme seconds messagers. Dans les ostéoblastes, les canaux responsables de l'influx induit par la PTH n'ont jamais été caractérisés. Des résultats non publiés de notre laboratoire montrent que la PTH stimule l'ouverture des canaux de la famille « transient receptor potential vanilloid » (TRPV), et induit ainsi un influx de calcium dans les cellules de la lignée ostéoblastique MG-63. Le but de mon projet était de confirmer les résultats préliminaires concernant les effets ostéo-anaboliques de la PTH et de déterminer le mécanisme d'activation des canaux TRPV par la PTH et son impact sur les fonctions de la lignée ostéoblastique humaine U2OS. Premièrement, l'expression génique des récepteurs de la PTH, (PTH1R et PTH2R) a été d'abord confirmée par RT-PCR. Cette technique a aussi mis en évidence l'expression des canaux TRPV1, TRPV2 et TRPV4 dans les cellules U2OS. Ensuite, les résultats de microscopie confocale ont montré que la PTH et la forskoline, un activateur direct de l'adénylate cyclase, stimulent l'influx de calcium dans les cellules U2OS, ce qui suggère un rôle de la voie de signalisation associée à l'AMPC. De plus, cet influx de calcium est renversé par un inhibiteur sélectif des canaux TRPV1, le SB366791, ce qui démontre l'implication de ces canaux dans l'influx de calcium induit par la PTH et la forskoline. Nos résultats indiquent également que la kinase PKA semble impliquée

dans le mécanisme menant à l'influx calcique et à l'ouverture de TRPV1. Par ailleurs, notre analyse de la prolifération cellulaire révèle un impact positif de la stimulation des TRPV1 par la PTH. En effet, bien que les résultats soient préliminaires, le test d'activité métabolique et de prolifération MTT montre une augmentation de la division cellulaire des U2OS en présence de PTH et forskoline. Cet effet est partiellement inhibé par l'inhibiteur de TRPV1, démontrant l'importance de l'influx de calcium engendré sur la régulation de la croissance des ostéoblastes. Pour finir, l'évaluation du pourcentage de recouvrement cellulaire après un traitement avec la PTH a démontré un impact positif de cette hormone sur la migration des ostéoblastes. Cet effet a été renversé par l'inhibiteur des canaux TRPV1, indiquant, une fois de plus, l'importance de l'influx de calcium engendré sur la régulation de la migration des ostéoblastes. Toutefois, contrairement aux résultats précédents, la stimulation par la PTH semble indépendante de la voie de signalisation associée à l'AMPC. En conclusion, notre étude montre que la PTH stimule un influx de calcium dans les cellules ostéoblastiques humaines U2OS par la voie de signalisation associée à l'AMPC et à la PKA. Cet influx calcique est véhiculé par les canaux TRPV1 et confère un effet bénéfique sur la migration et prolifération des cellules. Il reste à établir si la stimulation par la PTH influence la différenciation des ostéoblastes et à étudier le rôle de ces canaux *in vivo*.

Mots clés : ostéoporose, ostéoblaste, hormone parathyroïdienne, AMPC/PKA, calcium, canaux calciques TRPV.

INTRODUCTION

L'ostéoporose est une maladie métabolique qui est caractérisée par une détérioration de la microarchitecture de l'os, ainsi qu'une diminution de sa masse. Cette détérioration osseuse compromet la résistance de l'os et entraîne des risques accrus de fractures (Santé Canada).

L'ostéoporose provient d'un déséquilibre entre les processus de résorption du tissu osseux, effectuée par les ostéoclastes, et de formation osseuse, réalisée par les ostéoblastes (Hadjidakis et Androulakis, 2006). Ces deux processus assurent le renouvellement ou remodelage du tissu osseux qui est régulé aussi bien par des facteurs locaux que systémiques (Hadjidakis et Androulakis, 2006). La parathormone (PTH) est une hormone sécrétée en cas d'hypocalcémie et agit en tant que facteur systémique au niveau des reins, de l'intestin et des os (Marieb et Hoehn, 2005). Au niveau rénal, la PTH stimule la réabsorption tubulaire du calcium et la formation de la vitamine D active qui permet l'absorption intestinale du calcium (Ward *et al.*, 2012 ; Lips, 2006 ; Mutgi et Koo, 2012). Au niveau osseux, la PTH agit sur les ostéoblastes en stimulant l'expression du « Receptor-Activator of NF-kappa B ligand » (RANKL), une protéine membranaire qui va interagir avec les précurseurs ostéoclastiques et déclencher leur maturation et activation. Il en découle donc une augmentation de la résorption de l'os (Marieb et Hoehn, 2005). Ainsi, la PTH a un effet catabolique sur l'os en favorisant la mobilisation du calcium du tissu osseux vers la circulation afin de réguler la calcémie (Marieb et Hoehn, 2005). Cependant, les travaux de recherche des quinze dernières années ont démontré que cette hormone exerce également un effet anabolique sur le remodelage osseux en stimulant la formation d'os par les ostéoblastes (Cranney *et al.*, 2006). En effet, lorsque la PTH est injectée de manière

intermittente à de faibles doses chez des personnes ayant un profil ostéoporotique, elle entraîne une augmentation de la masse osseuse (Cranney *et al.*, 2006). Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ce rôle anabolique qui implique des mécanismes aussi bien directs qu'indirects. Tout d'abord, la PTH agirait de manière directe en réduisant l'apoptose des ostéoblastes (Schnoke et Midura, 2009), en diminuant l'expression de la sclérotine, une protéine qui inhibe la différenciation des ostéoblastes et en induisant l'expression du gène *C-FOS* qui code pour une protéine permettant d'augmenter la prolifération et la différenciation des ostéoblastes (Misiowski, 2011 ; Hock, 2001). D'autre part, la PTH jouerait aussi un rôle indirect sur la formation osseuse en régulant différents facteurs tels que le facteur de croissance apparenté à l'insuline (« Insulin-like Growth Factor » ou IGF), un agent anabolique puissant impliqué dans le processus d'absorption du calcium ainsi que dans les processus d'élongation et d'élargissement des os (Misiowski, 2011).

Notre laboratoire a récemment montré que la PTH induit une entrée (influx) calcique dans les ostéoblastes. Cet influx serait véhiculé par les canaux de la famille TRPV, qui font partie de la superfamille des canaux cationiques « transient receptor potential » (TRP), intervenant dans plusieurs fonctions homéostatiques cellulaires (Nilius *et al.*, 2007). Par ailleurs, les TRPV sont modulés par le calcium et modulent eux-mêmes la concentration de calcium intracellulaire (Yu *et al.*, 2005). Ce dernier est un second messenger impliqué dans plusieurs cascades de signalisation menant à la régulation de diverses fonctions cellulaires telles que la prolifération et la migration (Macrez et Mironneau, 2004). Ces deux dernières fonctions sont très importantes au niveau osseux car elles maintiennent l'intégrité des os.

Étant donné le rôle anabolique de la PTH dans le métabolisme osseux, il est important de mieux connaître la ou les voie(s) de signalisation qui lui est/sont associée(s) afin d'identifier une nouvelle cible pour augmenter la formation et la régénération du tissu osseux. Nos résultats préliminaires mettent en évidence le rôle du calcium comme un second messenger de cette voie de signalisation dans les cellules

ostéoblastiques humaines MG-63. Nous voudrions confirmer ces résultats dans un deuxième modèle cellulaire humain, en utilisant la lignée ostéoblastique U2OS. Cette dernière étape est importante car les cellules MG-63 sont issues d'un ostéosarcome, ce qui signifie qu'elles peuvent avoir un phénotype et un génotype particuliers qui diffèrent des ostéoblastes sains. Ainsi, une fois les résultats confirmés, nous pourrions documenter les mécanismes impliqués dans la régulation de la concentration intracellulaire de calcium par l'étude des canaux calciques. La voie de signalisation de la PTH est généralement associée à l'AMPC et à l'activation de la kinase PKA (Swarthout *et al.*, 2002). Notre projet a comme objectifs de vérifier l'implication de la voie de signalisation AMPC-PKA dans l'ouverture des canaux calciques et d'évaluer l'impact de cet influx calcique sur les fonctions ostéoblastiques telles que la migration et la prolifération.

CHAPITRE I : ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 L'ostéoporose

L'ostéoporose est une maladie métabolique caractérisée par une faible masse osseuse et une détérioration micro-architecturale du tissu osseux. Cette maladie est associée à une fragilité des os ainsi qu'à un risque accru de fractures (Santé Canada). Selon les données de l'organisme Santé Canada, « environ une femme sur quatre et un homme sur huit de plus de cinquante ans souffrent d'ostéoporose », soit 1,4 millions de canadiens. Plusieurs facteurs contribuent au développement de l'ostéoporose et la cause la plus commune est un déséquilibre au niveau du processus physiologique qui est responsable de l'intégrité de l'os, soit son remodelage. Celui-ci assure le maintien d'une masse osseuse adéquate en préservant l'équilibre entre la phase de résorption-dégradation de l'os et celle de formation osseuse (Hadjidakis et Androulakis, 2006). C'est lorsque la phase de résorption prend le dessus que l'ostéoporose apparaît. Ce déséquilibre peut être dû entre autre à une sénescence précoce des cellules formatrices de l'os, à une perte de leur prolifération et de leur différenciation, ainsi qu'à une diminution du « pool » des cellules souches (Marie et Kassem, 2011). Par ailleurs, la dysfonction des cellules responsables de la résorption et l'augmentation de la dégradation osseuse peuvent aussi être en cause (Khosla et Roggs, 2005). Il existe d'autres facteurs indirects qui sont également responsables de l'évolution de cette maladie. En effet, les femmes ménopausées sont plus touchées que les hommes en raison de la baisse des œstrogènes dans leur organisme (Santé Canada). De plus, le mode de vie, le tabagisme et l'alimentation par exemple jouent un rôle considérable dans la progression de l'ostéoporose (Marie et Kassem, 2011). Le nombre de personnes atteintes de cette maladie n'est pas près de baisser considérablement.

le vieillissement de la population et les habitudes de vie de plus en plus sédentaires. Ainsi, les coûts relatifs à l'ostéoporose ne cessent d'augmenter et il est très important de mieux comprendre les processus physiologiques et moléculaires modulant le métabolisme du tissu osseux, dans le but de prévenir l'ostéoporose et de la soigner efficacement à l'aide de stratégies bien ciblées.

1.2 Le métabolisme osseux

1.2.1 Le tissu osseux

L'os est un tissu conjonctif responsable de plusieurs fonctions dans le corps humain. Tout d'abord, il protège les organes vitaux (ex : cage thoracique) ainsi que la moelle osseuse grâce à sa matrice extracellulaire très solide. De par sa fixation aux muscles, l'os sert également à la locomotion. Et enfin, le tissu osseux joue un rôle métabolique puisqu'il permet l'homéostasie du taux de calcium et de phosphate sanguin. En effet, selon les besoins de l'organisme, le tissu osseux participe à la mise en réserve ou au relâchement de ces deux minéraux (Hadjidakis et Androulakis, 2006 ; Trouvin et Goeb, 2010).

La matrice de l'os est divisée en deux phases : la phase organique et la phase minérale. La première représente 35% de la masse osseuse et est composée de 90% de collagène de type I, une protéine fibreuse essentielle à la structure du tissu, et de 10% de protéines non collagèneuses telles que l'ostéonectine, l'ostéopontine, l'ostéocalcine, la thrombospondine et des protéoglycanes qui contribuent à la cohésion et à la minéralisation de la matrice (Ducy *et al.*, 1996). La partie minérale de la matrice (i.e. 65% de la masse osseuse) se compose majoritairement de cristaux d'hydroxyapatite ($3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot (\text{OH})_2$), un assemblage de phosphate et de calcium qui

s'insère entre les fibres de collagène. La minéralisation de la matrice ainsi que les cristaux d'hydroxyapatite confèrent au tissu osseux sa flexibilité et sa solidité (Ducy *et al.*, 1996 ; Marieb et Hoehn, 2005).

Il existe deux types de tissus osseux dans le corps humain : l'os cortical ou compact et l'os trabéculaire ou spongieux (Figure 1.1). L'os cortical constitue la partie externe de toutes les structures squelettiques et représente 80% de la masse osseuse, étant calcifié et de nature dense. La fonction première de l'os cortical est de fournir un support mécanique et une protection des organes. En revanche, l'os trabéculaire se retrouve à l'intérieur des os longs, des vertèbres et du pelvis et ne représente que 20% de la masse du squelette, mais 80% de la surface osseuse. Son rôle principal est de répondre aux besoins métaboliques de l'organisme (calcium) et d'apporter un support important. Malgré leurs différences anatomiques, ces deux types de tissu osseux ont une composition chimique similaire (Alder, 2000).

L'os est un organe dynamique dont le tissu est constamment renouvelé grâce au remodelage qui repose sur l'équilibre entre le processus de résorption et le processus de formation osseuse.

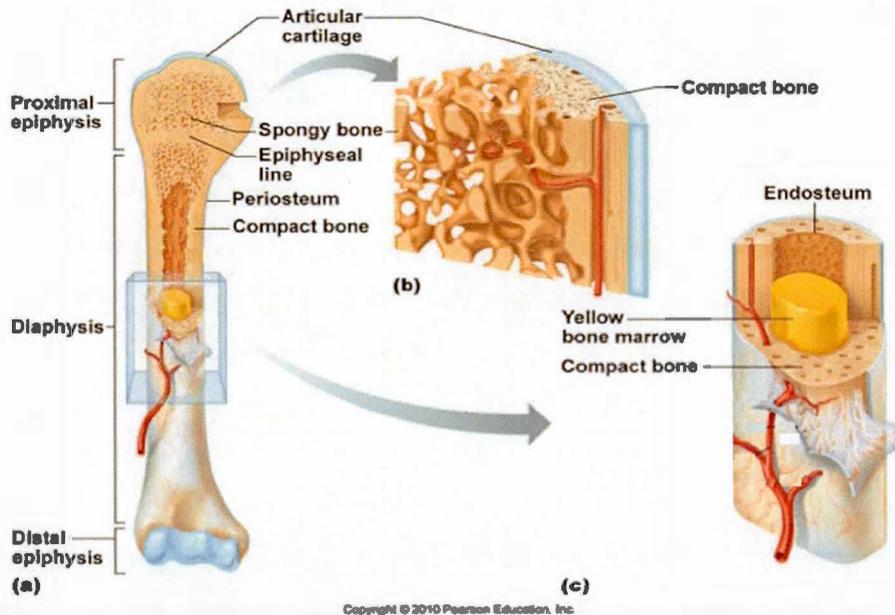


Figure 1.1 Structure d'un os long (humérus).

(a) Vue antérieure d'une coupe frontale montrant l'intérieur de l'extrémité proximale, l'épiphyse et la diaphyse. (b) Vue tridimensionnelle grossie de l'os spongieux et de l'os compact de l'épiphyse (c) Coupe transversale grossie du corps (diaphyse). Notez que la surface externe de la diaphyse est recouverte de périoste alors que la surface articulaire de l'épiphyse est recouverte de cartilage hyalin. Figure tirée de Marieb et Hoehn, 2005.

1.2.2 Les ostéoclastes et le processus de résorption osseuse

La résorption osseuse est effectuée par les ostéoclastes, de grandes cellules multi-nucléées, pouvant atteindre jusqu'à cent micromètres de diamètre, dérivées de la fusion de plusieurs cellules d'origine myéloïde (Teitelbaum, 2000). Suite à leur formation, les ostéoclastes se fixent à la surface de l'os grâce à des intégrines spécifiques présentes au niveau de leur membrane plasmique. Ils subissent alors une réorganisation du cytosquelette qui permet la formation de structures dynamiques appelées podosomes responsables de leur mouvement à la surface de l'os. C'est ainsi que débute le processus de résorption (Davies *et al.*, 1989 ; Reinholt *et al.*,

1990). De plus, les ostéoclastes ont une bordure en brosse qui délimite un microenvironnement appelé lacune de Howship où débute la résorption de l'os. En effet, les ostéoclastes y sécrètent des enzymes lysosomales, telles que la cathepsine K, qui dégradent la matrice organique de l'os ainsi que de puissants acides, à l'aide de pompes à protons, qui provoquent l'acidification et la solubilisation des cristaux d'hydroxyapatite de la matrice minérale (Vaananen *et al.*, 2000).

1.2.3 Les ostéoblastes et la formation osseuse

Le processus de formation commence suite à la dégradation de la matrice osseuse. Cette phase est réalisée par les cellules ostéoblastiques issues de la différenciation de cellules souches mésenchymateuses pluripotentes. Ces dernières ont également la capacité de se différencier en adipocytes, chondrocytes, myoblastes et fibroblastes (Bianco *et al.*, 2001). Leur différenciation vers la voie ostéoblastique est stimulée par des facteurs de croissance et de transcription comme les protéines morphogénétiques osseuses (« bone morphogenetic proteins », BMP) et le « Runt-related Transcription Factor 2 » (RUNX2) (Yamaguchi *et al.*, 2000). Suite à leur différenciation, les ostéoblastes prennent la place des ostéoclastes, qui sont entrés en apoptose, et débutent le processus de reconstitution de l'os. D'abord, les ostéoblastes synthétisent et sécrètent des protéines non collagéniques (i.e. l'ostéonectine, l'ostéopontine et l'ostéocalcine) et du collagène de type I qui forment la matrice ostéoïde non calcifiée qui sera ensuite calcifiée grâce à l'enzyme phosphatase alcaline produite par les ostéoblastes (Hadjidakis et Androulakis, 2006). Étant donné cette importante synthèse protéique nécessaire à la formation de l'os, les ostéoblastes sont dotés d'un réticulum endoplasmique rugueux et d'un appareil de Golgi abondants (Raggatt et Partridge, 2010).

1.2.4 Les ostéocytes

Lors du processus de formation osseuse, environ 15% des ostéoblastes s'entourent de lamelles de la matrice osseuse et se retrouvent ainsi trappés dans l'ostéoïde, en devenant des ostéocytes. Les ostéoblastes restants deviennent des cellules bordantes de l'os ou entrent en apoptose (Hadjidakis et Androulakis, 2006). L'activité fonctionnelle des ostéocytes varie selon leur âge. En effet, les « plus jeunes » ressemblent d'avantage aux ostéoblastes mais leur synthèse protéique diminue ainsi que de leur volume cellulaire. Cependant, les ostéocytes « plus vieux » accumulent le glycogène dans leur cytoplasme et ont tendance à être localisés plus profondément dans les zones calcifiées de l'os (Elmardi *et al.*, 1990). Ces cellules sont impliquées dans le déclenchement de la résorption osseuse. En effet, les ostéocytes sont reliés entre eux et avec les cellules à la surface de l'os par des extensions cytoplasmiques ou canalicules qui leur permettent de détecter les microlésions du tissu osseux et ainsi de sécréter des facteurs afin de recruter les ostéoclastes au niveau des sites où un remodelage de l'os est nécessaire (Lanyon, 1993). Ces canalicules permettent également le passage des nutriments et des déchets. Les ostéocytes participent donc au maintien de l'intégrité du tissu osseux (Marieb et Hoehn, 2005).

1.2.5 Le remodelage osseux

Comme indiqué précédemment, le tissu osseux est constamment renouvelé par le remodelage qui repose sur le partenariat entre les ostéoclastes et les ostéoblastes formant l'unité multicellulaire osseuse (« Bone Multicellular Units » ou BMU). Ce processus est constitué de quatre phases distinctes (Figure 1.2) : le recrutement et la différenciation des pré-ostéoclastes, la résorption qui s'effectue durant 2 à 3

semaines, l'inversion qui correspond au recrutement des pré-ostéoblastes puis la différenciation de ces derniers (4 à 5 semaines) et enfin la formation qui s'étale sur un période de 4 mois. La première étape débute avec la migration des précurseurs ostéoclastiques partiellement différenciés. Leur différenciation et activation dépendent du facteur stimulant les colonies de macrophage (« macrophage colony-stimulating factor » ou M-CSF), du ligand du « receptor-activator of NF-kappa B » (RANKL) et de l'ostéoprotégérine (OPG). Les ostéoblastes secrètent le M-CSF et sa fixation aux récepteurs c-Fms présents sur les précurseurs des ostéoclastes provoque la différenciation des monocytes en pré-ostéoclastes (Hofstetter *et al.*, 1992). À partir de ce stade, ces cellules expriment le récepteur « receptor activator of NF-Kappa B » (RANK) à leur surface qui lie le RANKL, un membre de la superfamille des « tumor necrosis factor » (TNF) exprimé et localisé sur la membrane plasmique des ostéoblastes. L'interaction entre ces deux protéines entraîne la fusion des pré-ostéoclastes en cellules multinucléées et l'activation des ostéoclastes, menant ainsi à l'acidification, ou autrement dit, à la solubilisation des cristaux d'hydroxyapatite et à la protéolyse de la matrice osseuse (Hsu *et al.*, 1999 ; Hadjidakis et Androulakis, 2006).

L'effet de RANKL peut être bloqué par l'OPG, un récepteur soluble appartenant également à la famille des TNF qui agit comme antagoniste de RANKL. Il s'agit d'une glycoprotéine sécrétée entre autre par les ostéoblastes qui, en inhibant la liaison RANK/RANKL, empêche la différenciation et l'activation des ostéoclastes, menant à leur apoptose (Hofbauer *et al.*, 2004 ; Simonet *et al.*, 1997). Une fois leur fonction accomplie, les ostéoclastes meurent par apoptose, ce qui marque le début de la phase d'inversion. Cette étape consiste en la préparation de la surface osseuse par des macrophages qui lissent le fond de la lacune de résorption pour préparer l'arrivée des ostéoblastes. Simultanément, les macrophages, les facteurs BMP et le « transforming growth actor TGF- β » (TGF- β) libérés de la matrice lors de la résorption donnent le signal nécessaire à la prolifération, la différenciation et la

migration des ostéoblastes vers la lacune de résorption (Hadjidakis et Androulakis, 2006 ; Frost, 1996). Enfin, le remodelage se termine par la formation d'un nouveau tissu osseux, qui est l'étape la plus longue. Tout d'abord, les ostéoblastes synthétisent la partie organique du tissu osseux en sécrétant le collagène de type I et les peptidoglycanes. Par la suite, ils participent à la minéralisation de la matrice, c'est-à-dire au dépôt de cristaux de calcium, de phosphate et de pyrophosphate. L'enzyme principalement responsable de cette phase est la phosphatase alcaline qui aide à la fixation de ces cristaux sur la matrice (Meunier *et al*, 2005). Durant le processus de formation osseuse, certains ostéoblastes s'entourent de matrice extracellulaire et deviennent par la suite des ostéocytes. Finalement, la surface de l'os est recouverte par des cellules bordantes qui sont des ostéoblastes dont l'activité métabolique est ralentie. Toutefois, ils ont la capacité de redevenir pleinement actifs lorsqu'il y a apparition de microlésions ou de déformations de l'os. C'est ce qu'on appelle la phase de quiescence (Hadjidakis et Androulakis, 2006).

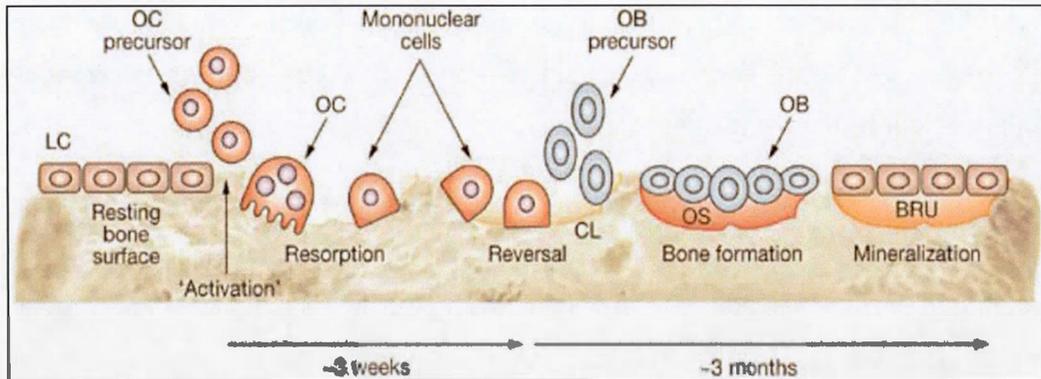


Figure 1.2 Les différentes étapes du remodelage osseux chez un individu sain.

Le remodelage osseux est initié par l'activation des ostéoclastes qui dégradent l'os et créent des lacunes de résorption. La résorption est suivie d'une étape d'inversion durant laquelle des cellules mononucléées préparent la surface osseuse afin d'accueillir les ostéoblastes. Par la suite, les précurseurs ostéoblastiques vont envahir la lacune, se différencier et entreprendre la formation de la matrice ostéoïde afin de remplir alors la cavité de résorption. Ce processus actif est la cible de plusieurs agents pharmaceutiques qui affectent la résorption et la formation de l'os. Abréviations : BRU, unité de remodelage osseux ou « bone remodeling unit » ; CL, ligne de ciment ou « cement line » ; LC, cellules bordantes ou « lining cells » ; OB, ostéoblaste ; OC, ostéoclaste ; OS, ostéoïde. Tirée de Deal, 2009.

1.2.6 La régulation du remodelage osseux

Le remodelage osseux est régulé par de nombreux facteurs systémiques tels que les glucocorticoïdes, l'oestrogène, la vitamine D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), la calcitonine et enfin la PTH. Les glucocorticoïdes sont connus pour leur double rôle au niveau du métabolisme osseux. D'une part, ils participent à la différenciation des pré-ostéoblastes en ostéoblastes matures et d'autre part ils diminuent aussi leur activité (Weinstein *et al.*, 1998). De plus, les glucocorticoïdes augmentent le recrutement des ostéoclastes favorisant ainsi la résorption osseuse et le développement de l'ostéoporose (Weinstein *et al.*, 1998). Par ailleurs, l'oestrogène stimule la prolifération et la différenciation des ostéoblastes et diminue leur apoptose (Okazaki

et al., 2002). L'œstrogène agit également au niveau des pré-ostéoclastes en diminuant leur réponse à RANKL et en augmentant la production d'OPG par les ostéoblastes diminuant leur formation (Srivastava *et al.*, 2001 ; Kameda *et al.*, 1997).

La PTH, la calcitonine et la vitamine D constituent les éléments les plus importants de la régulation du remodelage de par leur rôle dans le maintien de la calcémie. Ces trois facteurs travaillent de concert pour le maintien de l'homéostasie calcique (Marieb et Hoehn, 2005 ; Figure 1.3). Lorsque la calcémie chute, les récepteurs sensibles au calcium (CaR), présents sur la membrane des cellules de la glande parathyroïde, captent ce changement et entraînent la sécrétion de PTH. Cette hormone de 84 acides aminés agit au niveau des reins, de l'intestin et des os pour ramener la concentration sanguine de calcium à la normale. Dans les reins, la PTH stimule la réabsorption du calcium au niveau des tubules distaux en activant des canaux calciques ainsi que des échangeurs sodium (Na^+)/calcium (Ca^{2+}) (Brown et MacLeod, 2001 ; Ward *et al.*, 2012). La PTH permet la formation de la vitamine D sous sa forme active, le calcitriol. Ainsi, la cholécalciférol, sa forme inactive, est hydroxylée une première fois dans le foie sur le carbone 25 par la 25-hydroxylase donnant alors la molécule 25-hydroxy-cholécalciférol. Par la suite, cette dernière subira une seconde hydroxylation dans les reins, sur le carbone 1, par la 1-alpha-hydroxylase qui est une enzyme dont la synthèse est induite par la PTH (Lips, 2006). Le calcitriol ainsi formé permet l'absorption intestinale du calcium via les canaux « transient receptor potential vanilloid-6 » (TRPV6) en augmentant l'expression de ce transporteur calcique (Mutgi et Koo, 2012). Toutefois, la vitamine D active peut aussi être synthétisée suite à une réaction photochimique catalysée par les rayons ultraviolets (UV) ou peut aussi être apportée sous forme inactive par l'alimentation (Lips, 2006). Finalement, la PTH entraîne une mobilisation du calcium présent dans le tissu osseux. Sa liaison à un récepteur spécifique à la surface des ostéoblastes stimule la synthèse de RANKL menant à la maturation des ostéoclastes et donc à la résorption de l'os. Pareillement, cette liaison diminue la production d'OPG, un antagoniste du

lien entre RANKL et RANK (Marieb et Hoehn, 2005). Le principal opposant de la PTH dans la régulation de la calcémie est la calcitonine, une hormone sécrétée par les cellules parafolliculaires de la glande thyroïde en réponse à une hypercalcémie. La calcitonine est responsable de la diminution de la réabsorption tubulaire du calcium, de la baisse de la formation du calcitriol et enfin de l'inhibition de l'activité des ostéoclastes (Marieb et Hoehn, 2005).

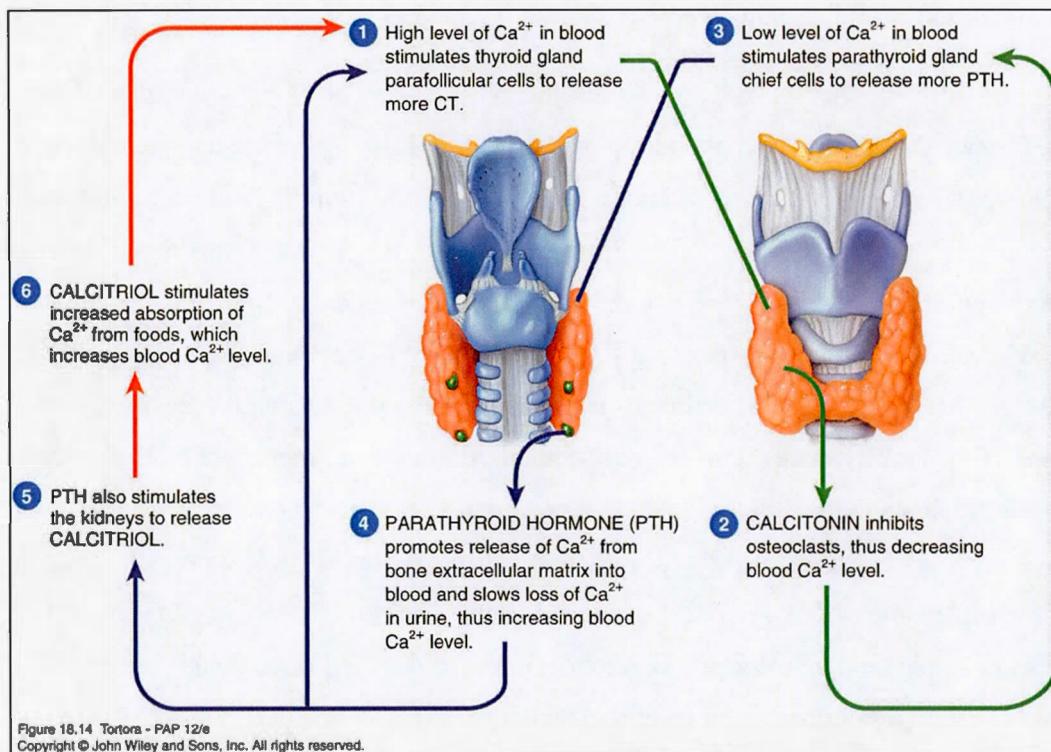


Figure 1.3 Rôle de la calcitonine, de la parathormone et du calcitriol dans l'homéostasie du calcium.

En cas d'hypercalcémie, la calcitonine sécrétée par la glande thyroïde (1), inhibe la résorption osseuse (2) ce qui réduit la calcémie (flèches vertes). Inversement, la PTH est sécrétée en situation d'hypocalcémie (3) et stimule la résorption de l'os (4) et la formation de calcitriol au niveau des reins (5 ; flèches bleues). Le calcitriol stimule l'absorption du calcium au niveau rénal et intestinal (flèches oranges). Figure tirée de Tortora et Derrickson, 2009, John Wiley and Sons, Inc.

1.3 La parathormone et les voies de signalisation intracellulaire

Tel que mentionné précédemment, la PTH joue un rôle aussi bien au niveau rénal, intestinal et osseux. Afin d'agir sur des cellules cibles, ce peptide de 84 acides aminés doit se lier à un de ses deux récepteurs : PTH1R ou PTH2R. Cette liaison se fait entre sa portion N-terminale (premiers 34 acides aminés) et le segment N-terminal extracellulaire du récepteur (Carter *et al.*, 1999 ; Luck *et al.*, 1999).

Le récepteur PTH1R, aussi désigné récepteur PTH/PTHrP, a la capacité de lier autant la PTH que le peptide apparenté à la PTH : « PTH related peptide » ou PTHrP. Ce dernier est un polypeptide présentant 16% d'homologie dans sa séquence en acides aminées avec la PTH. Plus précisément il possède 9 acides aminés en commun sur les premiers 13 acides aminés de leur segment N-terminal (Schlüter, 1999). Cette homologie permet au PTHrP de mimer l'effet de la PTH dans certains tissus (i.e. ostéoblastes, cellules des tubules rénaux) (Nabanita *et al.*, 2009). Toutefois, la différence au niveau des séquences d'acides aminés entre PTH et PTHrP souligne leurs rôles biologiques distincts dans le corps humain. En effet, ces polypeptides ont un profil d'expression qui diffère selon le stade de développement de l'organisme. Le PTHrP est principalement sécrété lors de la période fœtale puisqu'il régule le développement endochondral des os. Il peut agir de manière paracrine ou autocrine (Karaplis et Kronenberg, 1996).

Quant au PTH2R, sa séquence d'acides aminés partage 51% d'homologie avec le PTH1R. Leur principale divergence est que ce deuxième récepteur ne possède aucune affinité pour le PTHrP. De plus, le PTH2R est connu pour être majoritairement exprimé dans le cerveau (Usdin *et al.*, 1995).

Les récepteurs de la PTH possèdent 7 domaines transmembranaires et sont couplés à une protéine G trimérique (figure 1.4). Les protéines G sont composées de plusieurs sous-unités α , β et γ , et le type de sous-unité α diffère selon leur effecteur.

La sous-unité α_s stimule l'adénylate cyclase (AC) tandis que la sous-unité α_q stimule la phospholipase C (PLC). Dans le premier cas, lors de la stimulation du récepteur par la fixation de la PTH, un changement de conformation se produit au niveau de la sous-unité α_s qui s'accompagne d'un changement du GDP (guanosine 5'-diphosphate) en GTP (guanosine 5'-triphosphate). Une fois associée au GTP, la sous-unité α_s se dissocie du complexe trimérique et active l'AC (Neer, 1995 ; Gilman, 1987) qui catalyse la conversion de l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine 3' :5'-monophosphate cyclique (AMPc). Ce dernier agit comme un second messenger en activant la protéine kinase A (PKA). En effet, l'AMPc favorise la dissociation des sous-unités régulatrices, ce qui libère les sous-unités catalytiques de la PKA. Ces dernières peuvent, par la suite, engendrer différents effets dans la cellule, tant au niveau cytosolique qu'au niveau nucléaire, en induisant la phosphorylation de diverses protéines, canaux ioniques ainsi que de certains récepteurs. D'autre part, une fois que ces sous-unités de la PKA pénètrent dans le noyau, elles phosphorylent des facteurs de transcription, tels que la protéine « cAMP response element-binding » (CREB), et interviennent donc dans la transcription de certains gènes comme *C-FOS* (Simonds, 1999).

Par ailleurs, la PTH déclenche aussi une seconde voie de signalisation lors de sa liaison avec son récepteur. Il s'agit de celle impliquant la PLC (figure 1.4). Tel que précédemment, le GDP est échangé pour du GTP suite à la stimulation et au changement de conformation du récepteur qui entraîne un échange au niveau de la sous-unité α_q . Cette dernière active comme effecteur la PLC β qui est une enzyme qui hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂) en diacylglycerol (DAG) et en inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃). Le DAG et le IP₃ agissent comme seconds messagers en activant respectivement la protéine Kinase C (PKC) et en induisant le relargage du calcium contenu dans le réticulum endoplasmique lisse par l'activation des canaux IP₃R. La PKC phosphoryle différentes protéines dans la cellule, telles que le complexe « IkappaB Kinase β » (IKK β) responsable de l'activation du facteur de

transcription « nuclear factor-kappa B » (NF- κ B) impliqué dans la production de cytokines et la survie cellulaire (Kadamur et Ross, 2013).

Bien que la PTH active deux voies de signalisations distinctes, sa partie N-terminale, soit les 34 premiers acides aminés (1-34), possède des spécificités qui permettent de stimuler préférentiellement la voie de l'AMPc. En effet, ce sont ces acides aminés qui provoquent l'activation du récepteur, et plus précisément c'est la présence des deux premiers dans le peptide qui sont responsables de l'induction de la voie associée à l'AMPc. La production d'AMPc entraîne l'activation de la PKA qui régule différents processus dans les cellules tels que la transcription de certains gènes ou la concentration de calcium intracellulaire, comme nous allons le voir ci-dessous (Takasu *et al.*, 1999).

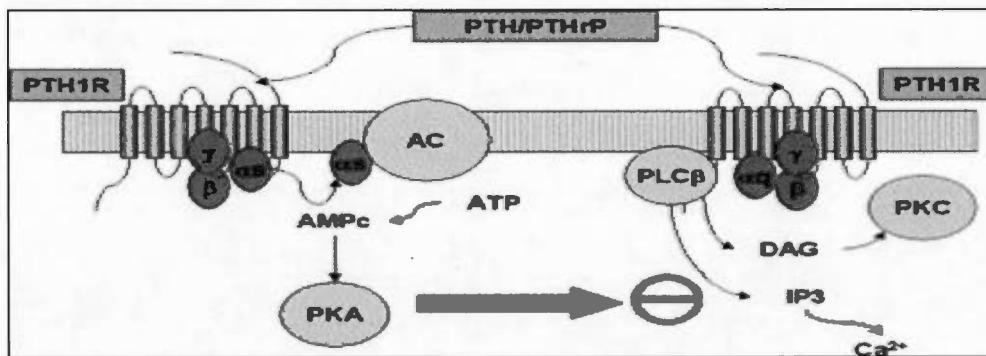


Figure 1.4 Signalisation du récepteur PTH/PTHrP (PTH1R).

Le récepteur commun de la PTH et du PTHrP active deux voies de signalisation intracellulaire associées aux sous-unités α s et α q des protéines G trimériques. La stimulation de la sous-unité α s mène à l'activation de l'adénylate cyclase, ce qui entraîne la production d'AMPc et l'activation de la PKA. Quant à la sous-unité α q, elle stimule la phospholipase C qui clive le PIP₂ en DAG et IP₃. Le DAG active ensuite la PKC alors que l'IP₃ induit un relargage du calcium à partir du réticulum endoplasmique lisse. Le signe « défendu » signifie que les deux voies de signalisation sont complètement indépendantes l'une de l'autre. Plus précisément, la PKA n'a pas d'effet sur DAG et IP₃. Abréviations : PTH : parathormone, PTHrP : « PTH related peptide », AC : adénylate cyclase, PKA : protéine kinase A, PKC : protéine kinase C, PLC : phospholipase C, DAG : diacylglycérol, IP₃ : inositol trisphosphate. Figure tirée de Gennero *et al.*, 2004.

1.4 Le calcium

Le calcium est un élément chimique essentiel impliqué dans de nombreux processus physiologiques. Il intervient entre autres en tant que second messager au niveau de la contraction musculaire, de la régulation des enzymes, de la division et de la mort cellulaire (Macrez et Mironneau, 2004). Ainsi, la régulation de la concentration intracellulaire de calcium est primordiale. Sa concentration cytosolique est généralement très basse, de l'ordre de 1-10 nM. En revanche, elle peut atteindre jusqu'à 100 nM dans le réticulum endoplasmique qui constitue une réserve accessible de calcium (Macrez et Mironneau, 2004).

La concentration de calcium est régulée par plusieurs processus. Au niveau de la membrane plasmique, on retrouve différents canaux ioniques selon le type cellulaire. Les canaux calciques voltage-dépendants (« Voltage-Dependent Calcium Channel » ou VDCC) sont généralement présents dans les cellules excitables. L'influx calcique qu'ils engendrent influence les fonctions cellulaires et leur rôle est bien connu dans la transmission de l'influx nerveux. Les canaux Transient Receptor Potential (TRP) sont quant à eux généralement insensibles au voltage et sont exprimés dans quasiment tous les types de cellules. Tout comme les VDCCs, l'influx de calcium qu'ils véhiculent permet la modulation de différentes fonctions dépendamment du type cellulaire. Il existe également des pompes calciques et des échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ au niveau de la membrane plasmique qui modulent l'entrée ou la sortie du calcium des cellules. Par ailleurs, les cellules possèdent aussi des mécanismes de régulation de calcium intracellulaires, notamment au niveau du réticulum endoplasmique. On fait alors référence aux pompes calciques dites SERCA (« Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPases ») et au canal IP_3 (Parekh et Penner, 1997 ; Lewis, 1999). Dans le cas de notre étude, nous nous concentrons sur les canaux TRP dans la régulation de l'entrée de calcium dans les ostéoblastes.

1.5 Les résultats préliminaires du laboratoire

Les résultats préliminaires d'un étudiant à la maîtrise, Jérôme Lizotte, indiquent que la PTH (1-34) stimule un influx de calcium dans les cellules MG-63 (Figure 1.5.A). Cet influx est bloqué sélectivement par un inhibiteur des canaux TRPV, le Ruthénium red (RR) (figure 1.5.B). Ainsi, ces résultats suggèrent l'implication de la PTH dans l'activation des canaux TRPV. La PTH utilisée dans ces expériences était la PTH (1-34), synthétisée à partir de ses trente-quatre premiers acides aminés. Or, comme expliqué précédemment, la présence des deux premiers acides aminés permet l'induction de la voie de signalisation associée à l'AMPC et à la PKA. On peut donc penser que cette cascade cellulaire est impliquée dans la stimulation des canaux TRPV par la PTH.

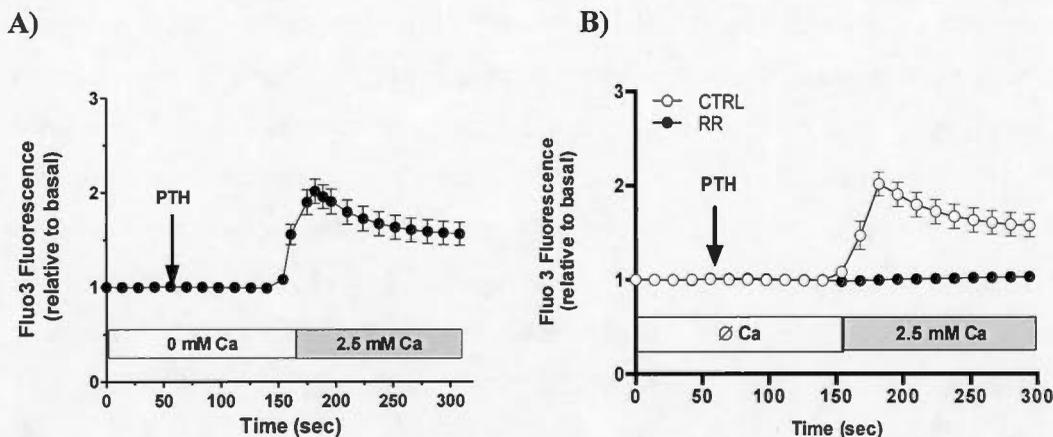


Figure 1.5 Effet de l'inhibiteur des canaux TRPV, le ruthénium red, sur l'influx calcique induit par la PTH.

Les cellules ostéoblastiques humaines MG-63 ont été marquées avec la sonde calcique Fluo-3AM et ont été transférées dans un milieu sans calcium et pré-incubées en absence (A) ou en présence (B) d'un inhibiteur des TRPV, le RR 10 μM . Les mesures de calcium intracellulaire ont été réalisées au microscope confocal. La PTH (1-34) 0,5 μM a été ajoutée au milieu sans calcium et ensuite du calcium a été ajouté afin de déterminer l'influx calcique. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD provenant de trois expériences indépendantes. Figures tirées du mémoire de Jérôme Lizotte, 2012.

1.6 Les canaux « Transient Receptor Potential »

1.6.1 Généralités sur les différentes familles

Les TRP forment une superfamille de canaux cationiques regroupés en 6 sous-familles selon leur homologie de séquence en acides aminés: TRPC (Canonique), TRPV (Vanilloïde), TRPM (Mélastatine), TRPP (Polycystine), TRPML (Mucolipine) et TRPA (Ankyrine) (Clapham *et al.*, 2005). Ces canaux sont principalement retrouvés dans les cellules épithéliales mais peuvent être présents dans tous les types

cellulaires et, selon le type de cellule, leurs stimuli et leurs mécanismes d'activation varient. Certains canaux sont sensibles à la température, d'autres à l'osmolarité ou à l'olfaction, au goût, à la vision ou encore certains sont impliqués dans la perception de la douleur (Nilius *et al.*, 2007). Lors de leur activation, la plupart des canaux TRP (TRPC, TRPV, et TRPM1, 2, 3, 6, 7, 8) sont responsables d'un mouvement de calcium à l'intérieur de la cellule (processus désigné influx de calcium), ce qui entraîne une augmentation de sa concentration et engendre une multitude de réponses cellulaires, comme nous l'avons abordé ci-dessus (Yu *et al.*, 2005). Toutefois, certains canaux comme les TRM6 sont perméables à d'autres ions tels que le magnésium (Mg^{2+}). La plupart des canaux TRP sont considérés faiblement voltage-sensibles et non sélectifs, à l'exception des TRPV5 et TRPV6 qui sont sélectifs pour le calcium (Yu *et al.*, 2005).

Par ailleurs, comme le montre la figure 1.6, les canaux TRV sont impliqués dans plusieurs pathologies (Wu *et al.*, 2010). Par exemple, une délétion du gène *TRPV1* altère les fonctions de la vessie.

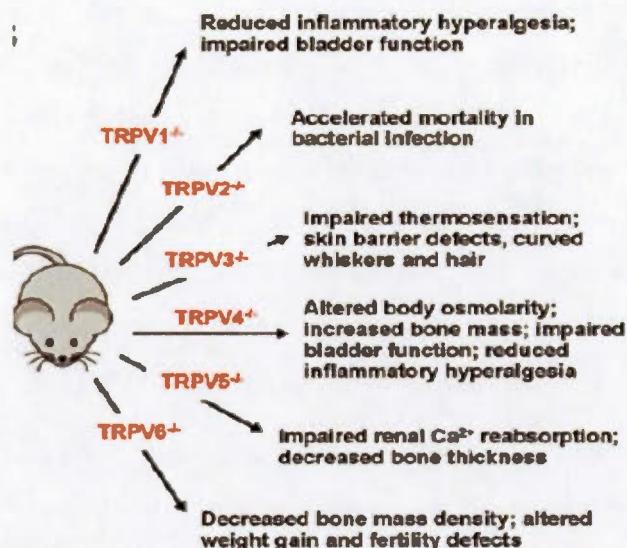


Figure 1.6 La famille TRPV (vanilloïde).

Résultats de délétions génétiques de *TRPV*, illustrées par le symbole *-/-*, signifiant une délétion homozygote. La délétion de *TRPV1* mène à une réduction de l'hyperalgésie. La délétion de *TRPV2* mène à une augmentation de la mortalité par des infections bactériennes. L'absence de *TRPV3* cause un problème de thermosensation et une barrière épidermique défectueuse. L'osmolarité du corps est altérée dans le cas de l'ablation de *TRPV4*. L'absence des canaux *TRPV5* génère un problème de réabsorption du calcium au niveau rénal. Et enfin, la délétion de *TRPV6* se traduit par une diminution de la masse osseuse. Figure tirée de Wu *et al.*, 2010.

1.6.2 Généralités sur les TRPV1

La sous-famille des canaux vanilloïdes compte 6 membres, dont les canaux TRPV1. La protéine TRPV1 se compose de 838 acides aminés et a ses domaines C-terminal et N-terminal intracellulaires (Caterina *et al.*, 1997).

Les canaux TRPV1 partagent une structure formée de 6 hélices transmembranaires (formant un tonneau alpha) avec la plupart des canaux TRP, avec

un pore α entre les hélices 5 et 6 (figure 1.7). On dit que ce sont des canaux tétramères car ils peuvent s'associer à des membres de la même famille et former des homo-tétramères ou des hétéro-tétramères. De plus, les canaux TRPV1 possèdent six répétitions de type ankyrine au niveau de leur portion N-terminale permettant les interactions protéine-protéine (Montell, 2005 ; Minke et Cook, 2002). Ces interactions peuvent mener à la phosphorylation ou déphosphorylation de protéines cibles ou encore à la liaison du PIP_2 qui régule l'insertion de TRPV1 à la membrane plasmique ainsi que sa sensibilité aux différents stimuli (Bevan *et al.*, 2014).

Les canaux TRPV1 sont principalement perméables aux ions Ca^{2+} (Tominaga *et al.*, 1998). Ils sont principalement retrouvés au niveau des fibres nociceptives de la racine dorsale myélinisées ou non, dans les neurones du ganglions trigéminal et inférieur (Helliwell *et al.*, 1998 ; Caterina *et al.*, 2000). Ces canaux sont importants pour la thermosensation/thermorégulation, soit dans la perception sensorielle d'un stimulus thermal. En effet, les souris TRPV1 (-/-) ont une hyperplasie thermique réduite suite à une blessure ou une inflammation (Caterina *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2000; Bölskei *et al.*, 2005). C'est d'ailleurs ces caractéristiques qui font de ce canal une bonne cible moléculaire pour le traitement de la douleur. D'autre part, TRPV1 intervient également dans le fonctionnement de la vessie (Birder *et al.*, 2002), dans la motilité intestinale (Rong *et al.*, 2004) et dans l'inflammation et les maladies reliées au système respiratoire (Geppetti *et al.*, 2006).

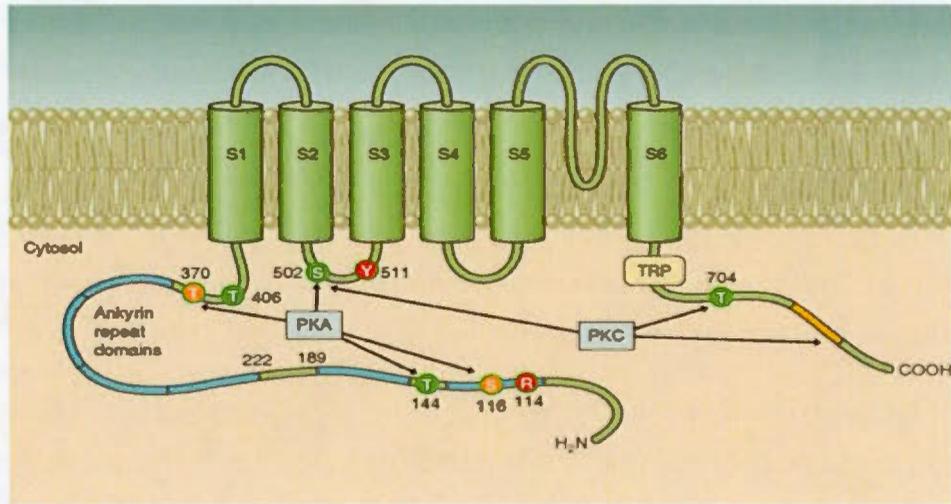


Figure 1.7 Représentation schématique d'une sous-unité du canal TRPV1.

La protéine TRPV1 est composée d'une région N-terminale cytosolique et de 6 domaines transmembranaires (vert), incluant le pore et une queue C-terminal intracellulaire. La région N-terminale contient un domaine qui consiste en 6 répétitions d'ankyrines (bleu). Cette protéine possède de multiples sites de régulation, notamment pour PKC et PKA. Figure tirée de Bourinet *et al.*, 2014.

1.6.3 Rôle des canaux TRPV1 au niveau de l'os

Au niveau osseux, les canaux TRPV1 sont à la fois exprimés par les ostéoblastes et les ostéoclastes, ce qui suggère un rôle dans le remodelage osseux (Lieben et Carmeliet, 2012). Les études démontrant un lien entre les canaux TRPV1 et les fonctions ostéoblastiques sont rares. L'équipe de Idris *et al.*, (2010) a démontré que TRPV1 participe à la différenciation des ostéoclastes et des ostéoblastes ce qui suggère son implication dans l'acquisition des fonctions cellulaires. Par ailleurs, la stimulation de TRPV1 par la capsaïcine augmente le ratio OPG/RANKL dans des cultures primaires d'ostéoblastes humain : l'expression d'OPG est augmentée alors que celle de RANKL est inchangée. Il semble donc que l'activation de ces canaux

apporte un effet protecteur de l'architecture osseuse (Sooampon *et al.*, 2013). L'homéostasie des os repose aussi bien sur le calcium extracellulaire qu'intracellulaire qui est impliqué dans plusieurs cascades menant à la régulation des fonctions cellulaires. Il a été rapporté que les canaux TRPV1 se localisent également au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. Leur activation permet donc le relâchement de calcium provenant des réserves intracellulaires et ainsi la régulation de plusieurs voie de signalisation (Turner *et al.*, 2003).

Tel que mentionné précédemment, les études fonctionnelles reliant le métabolisme osseux et les canaux TRPV1 sont quasi inexistantes. Aucun article ne relate une corrélation entre les canaux TRPV1 et la prolifération ostéoblastique. En revanche quelques travaux ont été réalisés sur d'autres modèles cellulaires tels que les cellules de la prostate, les cellules endothéliales, épithéliales, les cellules des voies aériennes, les neurones ou encore les kéatinocytes (Morelli *et al.*, 2014 ; Hofman *et al.*, 2014 ; Takahashi *et al.*, 2014 ; Zhao *et al.*, 2014 ; Stock *et al.*, 2014 ; Denda *et al.*, 2010). Toutes ces études démontrent une stimulation de la prolifération cellulaire *via* l'activation de TRPV1. L'entrée de calcium dans ces cellules entraîne l'expression de gènes clés menant à une augmentation du pourcentage de cellules en phase S/G2M dans le cycle cellulaire. La seule exception est au niveau des précurseurs neuronaux où le rôle de TRPV1 semble être antiprolifératif.

Pareillement, aucune étude ne montre de lien entre les canaux TRPV1 et la migration des ostéoblastes. Toutefois, quelques travaux ont démontré qu'un influx de calcium était nécessaire pour la migration cellulaire (Scwab *et al.*, 2007 ; Komuro et Rakic, 1998 ; Yang et Huang, 2005 ; Rao *et al.*, 2006). La migration est un processus complexe qui nécessite des changements simultanés de la morphologie et de l'adhésion de la cellule, et ces deux étapes dépendent d'une concentration intracellulaire optimale de calcium permettant la contraction cellulaire et la formation de lamellipodia/pseudopodia (Ridley *et al.*, 2003 ; Goswami *et al.*, 2006). L'augmentation de la concentration calcique implique entre autres l'activation des

canaux TRPV1 (Vriens *et al.*, 2004). Par ailleurs, la partie C-terminal de TRPV1 est connue pour interagir avec les microtubules en présence de calcium ce qui permet de les stabiliser. La cellule peut alors s'étendre et initier sa migration. En revanche, l'activation de ces canaux entraîne le désassemblage des microtubules dynamiques, facilitant la rétraction d'une partie de la cellule et créant un « trailing edge » (Goswami *et al.*, 2006).

La caractérisation *in vivo* du rôle de TRPV1 au niveau du métabolisme osseux montre que son inactivation par un traitement de capsazepine (1 mg/kg/jour) réduit la résorption chez les souris ayant subi une ovariectomie. En effet, l'équipe de Idris *et al.*, (2010) a rapporté une inhibition de la perte osseuse au niveau trabéculaire et une préservation de son épaisseur. Ainsi, ces souris, normalement propices à développer un profil ostéoporotique suite à la chute du taux d'oestrogènes, sont protégées contre la perte de masse osseuse. Par ailleurs, l'inactivation de TRPV1 entraîne une diminution de la formation osseuse due à une réduction de l'activité de la phosphatase alcaline et du nombre d'ostéoblastes (Idris *et al.*, 2010). Ceci suggère que ces canaux seraient impliqués dans le développement ostéoblastique et la formation osseuse. Cette étude a été menée par l'inhibition pharmacologique de TRPV1, ce qui implique un rôle de TRPV1 dans le remodelage osseux. Il n'existe pas de travaux détaillant le phénotype osseux de souris KO *Trpv1*, ce qui serait plus intéressant et précis comme information.

1.6.4 Régulation de l'activité des TRPV1

Les canaux TRPV1 sont connus pour être thermosensibles à des températures nocives (i.e >43°C), devenant perméables aux cations au-delà de 43°C (Caterina *et al.*, 1997). Ces canaux peuvent aussi être activés par un faible pH (i.e < 5,9) ainsi que par la capsaïcine, molécule retrouvée dans notre alimentation, notamment dans les

piments (Jordt *et al.*, 2000 ; Iida *et al.*, 2003). De plus, les TRPV1 peuvent également être stimulés par des ligands endogènes tels que les métabolites de l'acide arachidonique (Hwang *et al.*, 2000), l'anandamide (Zygmunt *et al.*, 1999), le *N*-arachidonoyldopamine (Huang *et al.*, 2002) et le *N*-oleoyldopamine (Chu *et al.*, 2003). La régulation de l'activité des TRPV1 implique des signaux intracellulaires incluant le Ca^{2+} , l'ATP, la calmoduline (CaM) et les phosphoinositides qui sont des phospholipides qui participent à la voie de signalisation cellulaire associée à la PLC et PKC (Zhu, 2005 ; Rohacs et Nilius, 2007). Le sous-groupe dont fait partie TRPV1 est principalement modulé par la CaM, une protéine fixatrice de Ca^{2+} intracellulaire. En effet, la portion C-terminale Ca^{2+} -dépendante de la CaM potentialise l'activité des canaux TRPV1 lorsque la concentration intracellulaire de calcium est anormalement basse. D'un autre côté, la portion N-terminale de TRPV1 inhibe son activité lorsque la concentration de calcium dans la cellule est optimale (Rosenbaum *et al.*, 2004 ; Lishko *et al.*, 2007). L'ATP intracellulaire va, quant à lui, entrer en compétition avec la CaM pour se lier aux répétitions d'ankyrines et donc améliorer le courant calcique via TRPV1 et prévenir sa désensibilisation (Lishko *et al.*, 2007). Tout comme l'ATP, le PIP_2 rentre également en compétition avec la CaM, sensibilisant TRPV1 (Kwon *et al.*, 2007). Pour finir, l'activité de TRPV1 est aussi régulée par la balance de Ca^{2+} dépendante de phosphorylation et déphosphorylation. En effet, la phosphatase calcineurine déphosphoryle le canal et permet sa désensibilisation (Docherty *et al.*, 1996), alors que l'activation de la PKC (Premkumar et Ahern, 2000) et de la PKA (De Petrocellis *et al.*, 2001) augmente l'activité de TRPV1.

Par ailleurs, de plus en plus de résultats montrent que les canaux TRP possèdent des séquences consensus de phosphorylation pouvant réguler leur activation. Il semblerait que les canaux TRPV1 puissent être stimulés par une phosphorylation dépendante de la PKC qui est une sérine/thréonine kinase. La phosphorylation se produirait sur les sérines⁵⁰²⁻⁸⁰⁰ et potentialiserait-sensibiliserait la réponse de ces canaux à la chaleur et à l'anandamide (Vellani *et al.*, 2001 ; Bhawe *et*

al., 2003 ; Premkumar et Ahern, 2000 ; Numazaki *et al.*, 2002). Les TRPV1 pourraient également être phosphorylés par la CaM-kinase II sur le résidu tyrosine⁷⁰⁴ et encore une fois sur la sérine⁵⁰². Cette phosphorylation serait même essentielle pour leur activation par la capsaïcine (Jung *et al.*, 2004). D'autre part, la réponse des TRPV1 à la chaleur (Rathlee *et al.*, 2002) et à la capsaïcine (Lopshire et Nicol, 1998) peut aussi être potentialisée suite à une phosphorylation de la sérine⁵⁰² par la PKA. Cette dernière peut également phosphoryler les résidus thréonine³⁷⁰ et sérine¹¹⁶, permettant d'amoinrir la désensibilisation des TRPV1. Toutefois, la thréonine³⁷⁰ peut être déphosphorylée par la calcineurine ce qui désensibiliserait alors les canaux (Bhave *et al.*, 2002 ; Mohapatra et Nau, 2005 ; Mohapatra et Nau, 2003). Il est important de mentionner que tous ces résultats proviennent d'expériences menées sur des cellules de rats, des variations peuvent donc être observées chez l'humain.

1.6.5 AKAP79/150 et TRPV1

La vitesse et la spécificité d'action des kinases dépendent souvent de leur liaison avec des protéines d'échafaudage comme « A-kinase Anchor protein » (AKAP) (Smith *et al.*, 2006). En effet, les protéines AKAP forment un complexe de signalisation composés d'unités kinases/phosphatases permettant donc la phosphorylation ou déphosphorylation de protéines spécifiques (Fraser et Scott, 1999 ; Faux et Scott, 1996). Il a été démontré par Zhang et McNaughton (2008) que TRPV1 forme un complexe avec PKA, PKC et la protéine phosphatase 2B (PP2B) qui sont intégrées au complexe AKAP79/150. Il semblerait que cette liaison soit essentielle à la sensibilisation de TRPV1 par PKC et PKA et donc son activation.

CHAPITRE II : HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Étant donné ses effets positifs sur la microarchitecture et la masse osseuse, la parathormone est actuellement le traitement offert pour contrer l'ostéoporose (Cranney *et al.*, 2006). Toutefois, les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans son effet anabolique sont encore méconnus. Des observations non-publiées de notre laboratoire confirment l'induction d'un influx calcique par la PTH dans un modèle d'ostéoblastes humains, les cellules MG-63. Considérant l'expression de plusieurs canaux de la superfamille des TRP dans les cellules ostéoblastiques humaines (Abed *et al.*, 2009), nous émettons l'hypothèse que ces canaux véhiculent l'influx engendré par la PTH. D'autre part, les récepteurs PTH1/2R sont connus pour activer l'adénylate cyclase et ainsi stimuler la production d'AMPc et l'engagement de la PKA (Takasu *et al.*, 1999). Compte tenu de l'implication de cette voie de signalisation dans l'effet anabolique de la PTH (Misiowski, 2011), nous émettons l'hypothèse que cette voie opère dans l'influx calcique stimulé par la PTH. Par ailleurs, nous savons que le calcium est un second messager impliqué dans de nombreuses voies de signalisation menant à la régulation de diverses fonctions cellulaires (Macrez et Mironneau, 2004), ce qui nous amène à émettre l'hypothèse que l'influx de calcium induit par la PTH enclencherait une cascade cellulaire calcium-dépendante, modulant les fonctions ostéoblastiques telles que la migration et la prolifération.

Notre premier objectif est de documenter l'implication des canaux TRP dans l'influx calcique dans les cellules ostéoblastiques humaines, et ce par microscopie confocale et l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs des canaux. Notre deuxième objectif consiste à étudier la voie de signalisation associée à l'influx calcique à l'aide d'inhibiteurs et de microscopie confocale. Notre troisième objectif est d'identifier un lien entre la stimulation de l'influx de calcium par la PTH et la régulation des

fonctions cellulaires dans les ostéoblastes humains (i.e. lignée U2OS) grâce à des mesures de recouvrement cellulaire et des mesures de prolifération tel que le test microtiter tetrazolium.

CHAPITRE III : MÉTHODOLOGIE

3.1 Culture cellulaire

La lignée cellulaire ostéoblastique humaine U2OS issue d'un ostéosarcome d'une jeune femme caucasienne de 15 ans a été utilisée. Ces cellules proviennent de l'« American Type Culture Collection » (ATCC ; USA) et sont décrites comme étant des cellules adhérentes, avec une morphologie de type épithélial, ce qui permet de réaliser des essais de prolifération, migration et différenciation cellulaires. Les cellules U2OS ont également l'avantage d'avoir un phénotype stable au cours des passages (ATCC ; USA) et elles ont été utilisées préférentiellement aux cellules MG-63 afin de confirmer les résultats préliminaires obtenus au laboratoire. En effet, les cellules MG-63 provenant d'un cancer des os, elles peuvent présenter un phénotype et génotype particuliers. Il est donc important de confirmer les résultats obtenus avec un autre type cellulaire.

Les cellules U2OS ont été cultivées dans du milieu de culture « Mc Coy » (Sigma-Aldrich, CAN) supplémenté avec 10% de sérum bovin fœtal (FBS; Cansera Etobicoke, CAN), 100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine (Invitrogen, CAN) et 2 mM de L-glutamine (Invitrogen, CAN), à 37°C dans une atmosphère humide à 5% CO₂. Les cellules U2OS ont été dispersées une fois par semaine en les décollant pendant 5 minutes avec de la trypsine 0,05%-EDTA 0,02% (Invitrogen, CAN) à 37°C, en les comptant et les réensemencant à une densité de 2000 cellules/cm² dans des pétris de 100 mm de diamètre (Sarstedt, CAN). Les milieux ont été changés trois fois par semaine.

3.2 Étude de l'expression génique par RT-PCR

Afin de déterminer l'expression génique des récepteurs PTH1R et PTH2R et des canaux calciques TRPV dans les cellules U2OS, des amplifications par polymérisation en chaînes (PCR) ont été réalisées. Les cellules ont été mises en culture dans des pétris de 60 mm diamètre (Sarstedt, CAN) et une fois qu'elles ont atteint 90% de confluence, leur ARN a été isolé selon la méthode d'extraction de Chomccynski et Sacchi (1987) qui utilise le TRIzol® (Invitrogen, CAN) comme réactif. L'ARN ainsi obtenu a été quantifié par spectrophotométrie à 260 nm, et par la suite a servi à la synthèse d'acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) grâce à l'enzyme transcriptase inverse de la trousse Omniscript™ RT (Qiagen, CAN) et en utilisant des hexamères. A partir de l'ADNc généré, des réactions PCR ont été effectuées avec de la trousse Taq PCR Core (Qiagen, CAN) en utilisant des amorces spécifiques désigné avec le logiciel NCBI Primer (tableau 3.1). Le gène *h-HPRT* a été utilisé comme contrôle interne étant qu'il est exprimé de manière constitutive dans les cellules (i.e. housekeeping gene). Les réactions PCR ont été réalisées à l'aide d'un appareil MyiQ (BioRad, CAN) selon les cycles suivants : une dénaturation initiale de 4 minutes à 94°C suivie de 40 cycles incluant une dénaturation de 30 secondes à 95°C puis une hybridation de 30 secondes à 58°C pour les tous gènes sauf *h-TRPV1* dont l'hybridation se fait à 60°C.

Tableau 3.1 Amorces utilisées pour les réactions PCR.

Gènes	Amorces sens 5'-3'	Amorces anti-sens 5'-3'
h-HPRT	GACCAGTCAACAGGGGACATAA	AAGCTTGCGACCTTGACC
h-PTH1R	GAAGCTGCTCAAATCCACGC	ATCTCAGCTTGTACCTCGCC
h-PTH2R	CGTGGCTCCGGCGACAAGAC	ATGCCCGGAACGGCTGTAGGA
h-TRPV1	GGACAAGTGGGACAGATTCGTC	CTCAGGATCATCTTCTCTATCATGACG
h-TRPV2	CAAGGGACTTGCTTTTATTTTCGG	CAGAAGCCAGGTCATACAGCG
h-TRPV3	CAACACCAAGGAGATAGTGCGG	TCCGCAGTAGGATCATGTCGTAC
h-TRPV4	ACACCAAGTTTTTACCAAGATGTACG	CGATCATGAAGAGCAAGTAGACGAG
h-TRPV5	TCTCGCTATTTTGGAAAGACGATTC	CAGCCAGCAGAAACGCATTAG

Légende : HPRT : hypoxanthine phosphoribosyltransférase.

Les produits PCR ont été analysés par électrophorèse (BioRad, CAN) sur gel d'agarose 2% et révélés sous UV suite à une coloration au RedSafe (iNtRON Biotechnology Inc., CAN). Les photos ont été analysées grâce au logiciel AlphaView, plus précisément le modèle AlphaImager 2009 (Alpha Innotech, FRA), puis analysées avec ImageJ.

3.3 Mesure de calcium intracellulaire

3.3.1 Technique de manipulation

Afin d'étudier la contribution de la voie de signalisation associée à l'AMPc à l'influx calcique induit par la PTH dans les ostéoblastes, des mesures de calcium intracellulaire ont été réalisées par microscopie confocale. Les cellules U2OS ont étéensemencées dans des Lab-Tek à 8 chambres (Nalgene Nunc, CAN) et ont ensuite été marquées avec 2 μ M de sonde calcique fluorescente Fluo3-acetoxyméthyl (Molecular Probes, USA) en présence de 20% de Pluronic F-127 (Life Technologies, Burlington, CAN) dans une solution saline (HBSS) composée de 121 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,8 mM MgSO₄, 25 mM HEPES, 1,8 mM CaCl₂ et 6 mM NaHCO₃. Les cellules ont

été incubées avec ce mélange sur plaque agitatrice, à l'obscurité, durant une heure. Par la suite, les cellules ont été rincées deux fois avec du HBSS et remises à l'obscurité sur plaque agitatrice pendant une heure d'incubation. Au début de l'observation en microscopie confocale, la solution de HBSS a été changée et remplacée par du HBSS sans calcium. La fluorescence de base a été mesurée sur une période de 30 secondes. Il s'agit de notre contrôle négatif étant donné qu'il n'y a aucun additif dans le milieu. Par la suite, à une minute quarante, le traitement (PTH ou forskoline – voir ci-dessous) a été ajouté. Cet ajout au milieu d'incubation sans calcium nous indique si le traitement engendre ou non une mobilisation calcique provenant du réticulum endoplasmique. Par la suite, le calcium a été ajouté à une concentration finale de 2,5 mM, et les mesures de fluorescence ont été enregistrées pendant trois minutes dans le but de détecter un influx de calcium dans les ostéoblastes. En effet, si une augmentation de la fluorescence des cellules est mesurée, nous pourrions conclure que le traitement stimule une entrée de calcium dans les ostéoblastes *via* un canal présent au niveau de la membrane plasmique. Toutes ces mesures ont été effectuées à l'aide d'un microscope confocal Nikon Eclipse Ti A1R avec un objectif Nikon 20X Plan Fluor. Le fluorochrome a été excité à 487 nm et l'émission collectée à 517 nm. Les données (intensités de fluorescence) obtenues ont été analysées avec le logiciel NIS-element (Nikon software, USA) afin d'analyser l'intensité de la fluorescence suite aux différents traitements.

3.3.2 Effets des différents traitements sur l'influx calcique

L'effet de différents traitements sur l'influx calcique ont été testés. Tout d'abord, la PTH (1-34) (Bachem Americas, USA) a été utilisée à une concentration finale de 0,5 μ M. Ensuite, l'activateur de l'adénylate cyclase (Sigma-Aldrich, CAN) forskoline (Sigma-Aldrich, CAN) a été utilisé à une concentration finale de 5 μ M.

Après vérification de l'expression des canaux TRPV par RT-PCR dans les cellules U2OS, une approche pharmacologique a été utilisée afin de déterminer le canal responsable de l'influx calcique engendré par la PTH et la forskoline. L'implication générale des TRPV a d'abord été vérifiée avec l'ajout d'un inhibiteur spécifique et sélectif, le Ruthénium red (Sigma-Aldrich, CAN) à une concentration finale de 10 μM . Par la suite, le Tranilast (Tocris, USA), inhibiteur des canaux TRPV2, le RN1734 (Sigma-Aldrich, CAN), inhibiteur de TRPV4, et le SB366791 (Tocris, USA), inhibiteur de TRPV1, ont été testés afin de discriminer la contribution relative de chaque canal dans l'influx calcique observé. Tous ces inhibiteurs ont été pré-incubés pendant 5 minutes avant le début des mesures d'influxcalciques. Le Tranilast a été utilisé à une concentration finale de 20 μM , le RN1734 à 15 μM et le SB366791 à 1 μM . Puis, la PTH et la forskoline ont été ajoutés tel qu'expliqué précédemment.

Afin de mieux caractériser l'influx calcique et l'implication de la voie AMPc/PKA, l'inhibiteur de la PKA, le H-89 (Sigma-Aldrich, CAN) a été employé à une concentration finale de 10 μM . Une fois de plus, les cellules ont été pré-incubées avec cet inhibiteur durant 5 minutes, puis l'influx calcique de base et en réponse aux différents traitements a été mesuré tel que mentionné ci-dessus.

Pour finir, un traitement avec de la capsaïcine, à une concentration finale de 100 nM, a été effectué dans le but de confirmer l'inhibition spécifique de TRPV1 par le SB366791. Cette étape est importante en raison du fait que les inhibiteurs pharmacologiques ont parfois des effets secondaires ou alors ne sont pas spécifiques. La capsaïcine étant un agoniste des canaux TRPV1, son utilisation combinée au SB366791 a permis de valider notre modèle expérimental.

3.4 Migration cellulaire

Dans le but d'identifier un possible lien entre l'influx calcique déclenché par la PTH et TRPV1 et les fonctions ostéoblastiques, une mesure de migration cellulaire par recouvrement a été effectuée. Les cellules U2OS ont étéensemencées dans des plaques de 24 puits (Sarstedt, USA), un sevrage (sans FBS) a été réalisé dans du milieu Mc Coy. Après 24 heures, une ligne verticale de cellules a été décollée à l'aide d'un embout et le milieu a été changé et remplacé par les mêmes traitements que précédemment (i.e. capsaïcine, PTH, forskoline, RR, SB366791) et les cellules ont été incubées à 37°C, 5% CO₂ pendant 18 heures. Les traitements ont été réalisés en absence de FBS car celui-ci amène, seul, une augmentation de la migration des ostéoblastes (données non-présentées). Des photos ont été prises toutes les 10 minutes pendant 18 heures avec une caméra DS-Qi1 Monochrome (Nikon, US) montée sur un objectif 10X à contraste de phase. Les photos ont été analysées à l'aide du logiciel NIS-element (Nikon software, USA) qui a permis de superposer les photos obtenues afin de déterminer le pourcentage de recouvrement en fonction du temps et des traitements.

3.5 Indice de prolifération par microtiter tetrazolium

Dans le but d'associer l'influx de calcium stimulé par la PTH *via* les canaux TRPV1 et les fonctions cellulaires, la prolifération des ostéoblastes a été évaluée par un essai colorimétrique MTT (microtiter tetrazolium). Ce dosage repose sur l'activité enzymatique de la succinate déshydrogénase, une enzyme mitochondriale qui réduit l'anneau de tetrazolium et donne ainsi des cristaux de formazan de couleur violette. L'ajout du diméthylsulfoxyde (DMSO) permet de solubiliser ces cristaux et de mesurer leur absorbance à une longueur d'onde de 575 nm. L'absorbance obtenue est

proportionnelle au nombre de cellules vivantes et sert d'indicateur de la prolifération cellulaire. Les cellules ont été mises en culture dans une plaque de 96 puits (Sarstedt, USA). Trois jours après l'ensemencement, les cellules ont été sevrés (culture sans FBS) pendant 24 heures dans du milieu McCoy, puis traités avec les mêmes substances que précédemment. Les traitements ont été réalisés en présence de 0,2% FBS afin d'éviter un stress aux cellules et de causer de l'apoptose. Une quantité plus élevée que 0,2% de FBS stimule naturellement la prolifération des ostéoblastes (données non-présentées), d'où le choix de cette concentration. Après 48 heures, une solution de MTT ((3,[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide ; Sigma-Aldrich, CAN) de 5 mg/ml a été ajoutée aux échantillons, le tout ayant été incubé à 37°C à 5% de CO₂. Après une heure et 30 minutes, le milieu de culture a été retiré et remplacé par 200 µL de DMSO (dimethylsulfoxyde). Enfin, suite à 30 minutes d'incubation à 37°C à 5% de CO₂, l'absorbance a été lue à 575 nm (Eon Microplate Spectrophotometer, BioTek). Les résultats obtenus ont été normalisés par rapport au J0, c'est-à-dire au jour où le sevrage débute (J0).

3.6 Analyses statistiques

Dans l'optique de confirmer la validité des résultats obtenus au cours de plus de trois expériences indépendantes, des analyses statistiques ont été réalisées. Ainsi, un test de variance ANOVA a été effectué avec le logiciel GraphPrism 5.0 (GraphPad Software, USA). Le seuil de significativité a été fixé à $P < 0,05$. L'analyse de variance a été choisie lors de l'étude de trois groupes.

CHAPITRE IV : RÉSULTATS

Le rôle anabolique de la PTH estimé *in vivo*, démontrant une augmentation de la densité minérale et une amélioration de la microarchitecture osseuse (Cranney *et al.*, 2006), a mené à des études cliniques permettant la formulation d'un nouveau traitement pour contrer l'ostéoporose avec la PTH synthétique: le Forteo. Toutefois, les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'effet bénéfique de la PTH sont encore méconnus. Puisque des traitements intermittents de PTH stimulent la formation osseuse, nous avons décidé d'étudier son impact sur les ostéoblastes humains, les cellules U2OS. Selon des observations non-publiées de notre laboratoire, la signalisation impliquée dans l'effet anabolique de la PTH est associée à un influx de calcium. Afin d'étudier comment la PTH régule la concentration intracellulaire de calcium, nous avons déterminé l'impact d'un traitement avec la PTH (1-34). L'effet anabolique de la PTH étant associé à la production d'AMPc (Misiowski, 2011), nous avons utilisé la partie N-terminale de cette hormone, composée des 34 premiers acides aminés (1-34), suffisante pour stimuler les voies de signalisation associées aux récepteurs PTH1R et PTH2R (Takasu *et al.*, 1999).

L'expression des récepteurs PTH a d'abord été confirmée dans la lignée cellulaire U2OS. Comme le montre la figure 4.1, les essais RT-PCR ont mené à l'amplification d'un ADN composé de 197 pb et d'un autre composé de 176 pb, correspondant respectivement aux tailles attendues pour les transcrits *pth1r* et *pth2r* (figure 4.1). Ainsi, la lignée cellulaire U2OS permet d'étudier de l'effet de la PTH sur les cellules ostéoblastiques humaines.

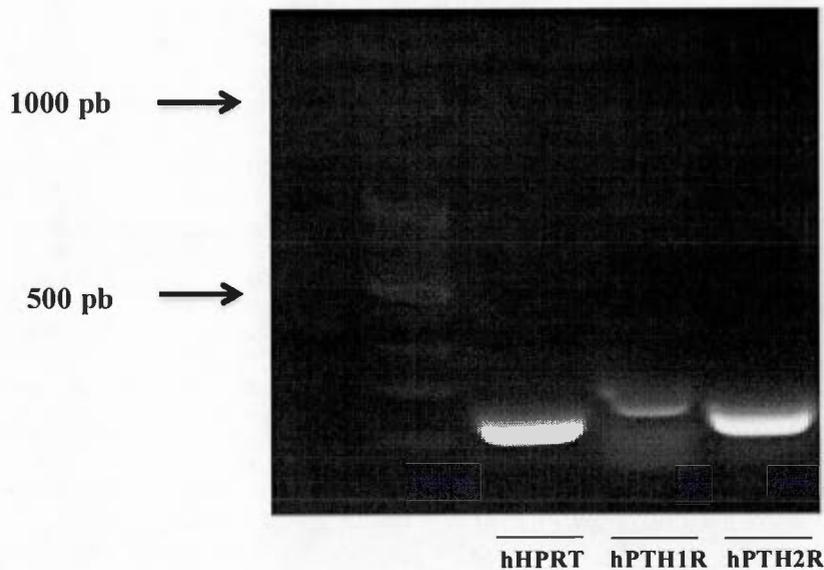


Figure 4.1 Expression génique des récepteurs de la PTH dans la lignée d'ostéoblastes humains U2OS.

L'ARN des cellules U2OS a été isolé par la méthode d'extraction de Chomccynski et Sacchi (1987) et utilisé pour synthétiser l'ADN complémentaire (ADNc) par transcription inverse (RT). Des amorces spécifiques d'un gène contrôle, le *h-HPRT* et pour *h-PTH1R* et *h-PTH2R* ont été utilisées pour amplifier l'ADNc par PCR. La figure présente une photo représentative de l'ADN amplifié suite à une électrophorèse sur gel d'agarose 2% et une révélation au RedSafe. Les tailles de produit PCR attendues sont de 166 pb pour HPRT, 197 pb pour PTH1R et 176 pb pour PTH2R. Le standard utilisé est un standard à intervalle de 100 pb.

Compte tenu de l'expression de PTH1R et PTH2R dans les cellules U2OS, nous avons effectué des mesures de calcium intracellulaires suite à une stimulation avec la PTH (1-34) (figure 4.2.A). Le niveau de calcium intracellulaire varie selon deux mécanismes : la libération du calcium du réticulum endoplasmique (qui constitue la réserve majeure du calcium intracellulaire) et l'influx du calcium du milieu extracellulaire *via* l'ouverture de canaux présents à la membrane plasmique (Parekh et Penner, 1997 ; Lewis, 1999). Pour identifier la source du calcium menant à une hausse de sa concentration intracellulaire, nous avons débuté nos mesures en

absence de calcium extracellulaire. Quand la PTH a été ajoutée au milieu dépourvu de calcium, la fluorescence associée à la sonde calcique Fluo-3 n'a pas été modifiée, ce qui suggère que cette hormone n'engendre pas de mobilisation de calcium provenant du réticulum endoplasmique (Figures 4.2.A). Par la suite, l'ajout de calcium dans le milieu a amené une augmentation marquée (1.5 fois) de la fluorescence suite à l'incubation des cellules avec la PTH, indiquant un influx de calcium dans la cellule et donc l'activation de canaux présents à la membrane plasmique. Cependant, il faut noter que la mobilisation du calcium provenant du réticulum endoplasmique a été vérifiée à l'aide d'un agent pharmacologique perturbant l'intégrité du réticulum endoplasmique (données non présentées). Les résultats obtenus montraient une nette augmentation de la fluorescence (3,5 fois par rapport au niveau basal).

Dans le but de déterminer quel récepteur de PTH, PTH1R ou PTH2R, déclenche l'influx de calcium, les cellules ont été traitées avec le PTHrP, un polypeptide fixant exclusivement PTH1R (Schlüter, 1999). Tel que la PTH, le PTHrP a conduit à une augmentation de la fluorescence en présence de calcium, confirmant la stimulation d'un influx calcique dans les cellules U2OS et l'implication du récepteur PTH1R dans le processus (figure 4.2.B).

Il est connu que la voie majeure de transduction de la PTH est associée à l'AMPc (Swarthout *et al.*, 2002). Afin de prouver, vérifier que la signalisation déclenchée par la PTH dans notre modèle est liée à la production d'AMPc, un activateur direct de l'adénylate cyclase, la forskoline a été utilisée. Il s'agit d'un diterpénoïde perméable, donc complètement indépendant des récepteurs membranaires, qui active directement l'adénylate cyclase (De Souza *et al.*, 1983). L'augmentation de l'activité de cette enzyme engendre une production cellulaire accrue d'AMPc (Simonds, 1999). L'addition de la forskoline dans le milieu dépourvu de calcium n'a pas exercé d'effet sur la fluorescence basale (figures 4.2.C), mais

l'ajout de calcium dans le milieu a entraîné une augmentation de la fluorescence, suggérant l'induction d'un influx calcique impliquant la voie de signalisation associée à l'AMPC (figure 4.2.C).

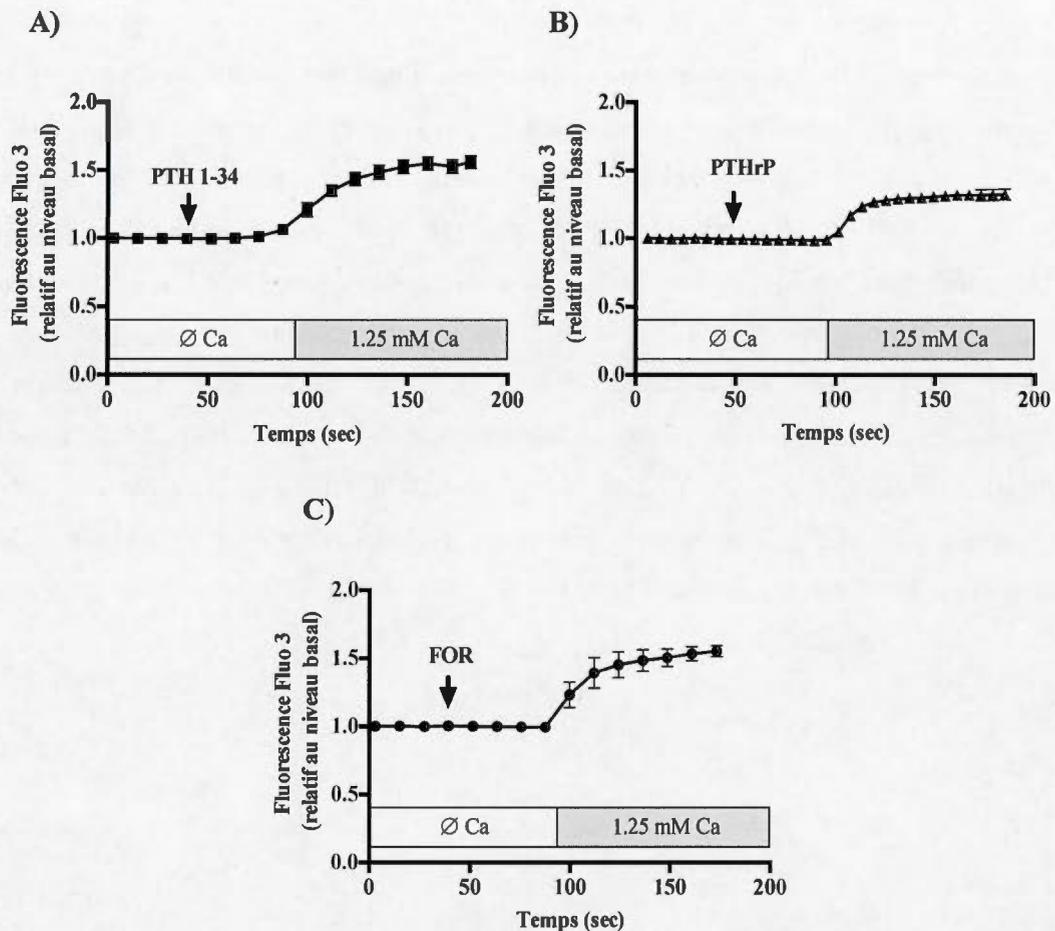


Figure 4.2 La PTH se fixe au récepteur PTH1R et stimule un influx calcique dépendant de l'AMPC dans les cellules U2OS.

Les cellules U2OS ont été marquées avec la sonde fluorescente Fluo-3 sensible au calcium, transférées dans un milieu d'incubation sans calcium. La PTH (1-34) 0,5 μ M (A), le PTHrP 0,5 μ M (B) ou la forskoline 5 μ M (C) ont ensuite été ajoutés au milieu. Les mesures de calcium intracellulaire ont été effectuées avec un microscope confocal à balayage laser. 1,25 mM de calcium a ensuite été ajouté au milieu d'incubation afin d'identifier un influx calcique. Les valeurs de fluorescence associées au Fluo-3 sont relatives à la fluorescence basale et représentent les moyennes \pm SEM de quatre expériences contenant 6 à 7 champs sous l'objectif (entre 20 et 30 cellules par champ).

Étant donné que la PTH et la forskoline stimulent un influx de calcium dans les cellules U2OS (figure 4.2), nous avons voulu identifier les canaux présents à la membrane qui seraient responsables de cet influx. D'après les travaux de Abed *et al.*, (2009) et des résultats non publiés du laboratoire, nous savons que les ostéoblastes humains expriment les canaux TRP et que, plus précisément, les canaux TRPV pourraient être impliqués dans l'influx de calcium stimulé par la PTH. Nous avons donc utilisé une approche pharmacologique, à l'aide des inhibiteurs sélectifs de canaux pour répondre à cet objectif. Comme le montre la figure 4.3, une pré-incubation des cellules avec le RR, un inhibiteur général des canaux TRPV, a bloqué l'influx de calcium normalement engendré par la PTH (figure 4.3.A) et la forskoline (figure 4.3.B). Ainsi, dans nos conditions expérimentales, ce sont les canaux de la superfamille TRPV qui sont activés.

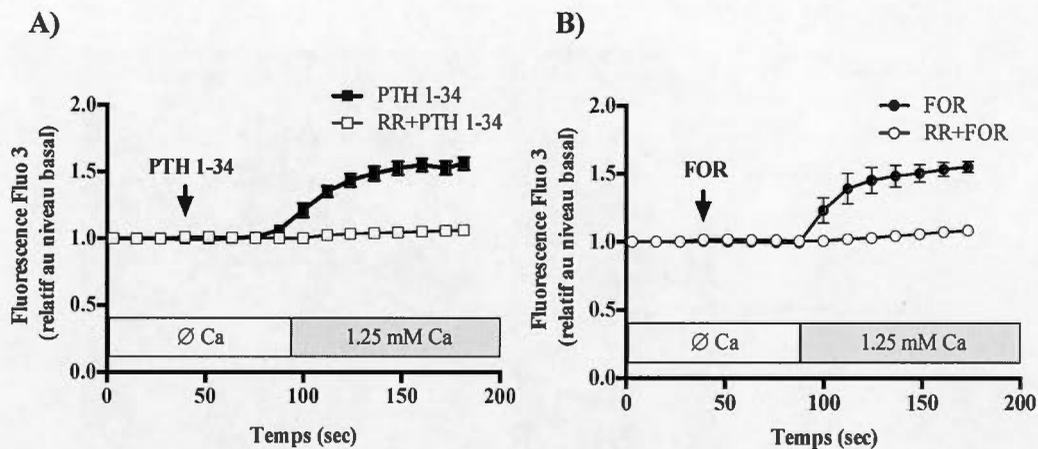


Figure 4.3 Activation des canaux TRPV par la PTH et la voie de signalisation associée à l'AMPC.

Les cellules ont été marquées avec la sonde fluorescente Fluo-3 sensible au calcium et pré-incubées 5 minutes en présence du RR $10 \mu\text{M}$ dans le milieu d'incubation sans calcium. Après 5 minutes, la PTH (1-34) $0,5 \mu\text{M}$ (A) ou la forskoline $5 \mu\text{M}$ (B) ont été ajoutés au milieu. Les mesures de calcium intracellulaire ont été effectuées avec un microscope confocal à balayage laser. Le calcium ($1,25 \text{ mM}$) a ensuite été ajouté au milieu d'incubation afin d'identifier un influx de calcique. Les valeurs de fluorescence associées au Fluo-3 sont relatives à la fluorescence basale et représentent les moyennes \pm SEM de quatre expériences contenant 6 à 7 champs (entre 20 et 30 cellules par champ).

La famille des canaux TRPV es composée de six membres (Wu et *al.*, 2010). Afin de déterminer quel membre de cette famille est responsable de l'influx calcique induit *via* la voie associée à l'AMPC, nous avons évalué leur expression génique dans les cellules U2OS. La figure 4.4 montre que des amorces spécifiques pour TRPV1, TRPV2 et TRPV4 ont permis d'amplifier des bandes avec des tailles attendues respectives de 452 pb, 432 pb et 866 pb respectivement. Cependant, aucun produit PCR n'a été observée pour les autres canaux de la famille des TRPV.

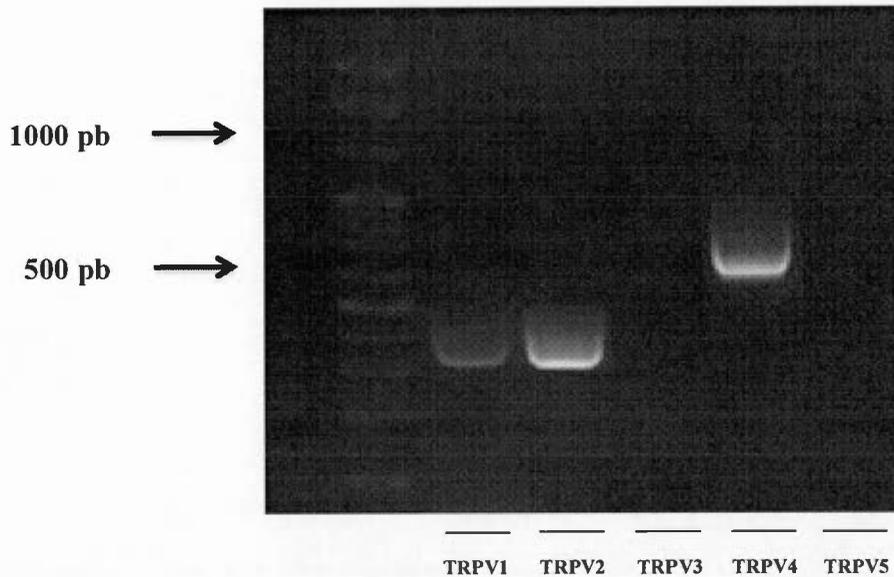


Figure 4.4 Expression génique des canaux TRPV1, TRPV2 et TRPV4 dans les cellules U2OS.

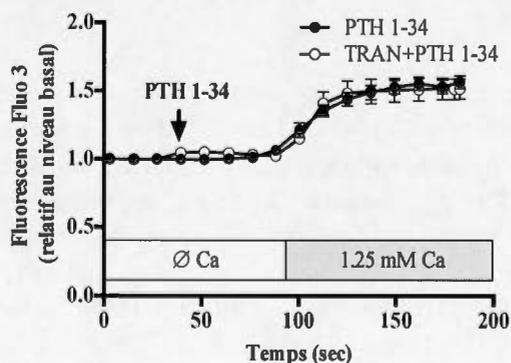
L'ARN des cellules U2OS a été isolé par la méthode d'extraction de Chomccynski et Sacchi (1987) et utilisé pour des analyses par RT-PCR des canaux de la famille TRPV. Des amorces spécifiques de *h-TRPV1*, *h-TRPV2*, *h-TRPV3*, *h-TRPV4* et *h-TRPV5* ont été utilisées pour amplifier l'ADNc par PCR. La figure présente une photo représentative de l'ADN amplifié suite à une électrophorèse sur gel d'agarose 2% et une révélation au RedSafe. Les tailles de produits PCR attendues sont respectivement de 452 pb, 432 pb, 439 pb, 866 pb et 251 pb. Un standard à intervalle de 100 pb a été utilisé.

Dans l'optique d'identifier lequel de ces trois canaux (i.e. TRPV1, TRPV2, TRPV4) véhicule l'influx de calcium suite à une stimulation avec la PTH, nous avons utilisé des inhibiteurs sélectifs. Comme le montre la figure 4.5, l'influx calcique engendré par la PTH et la forskoline est encore présent suite à une pré-incubation des cellules avec l'inhibiteur sélectif des canaux TRPV2, le Tranilast (figure 4.5.A et 4.5.B), ce qui exclue l'implication de TRPV2. Pareillement, une pré-incubation avec

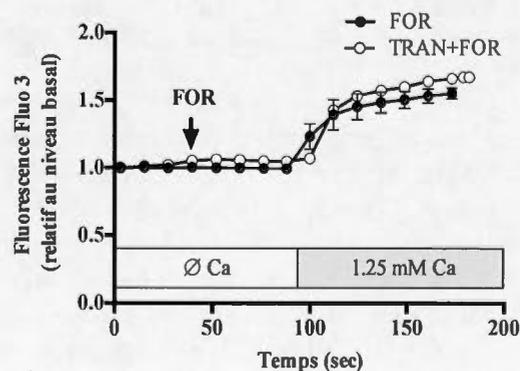
le RN1734, un inhibiteur des TRPV4, n'a pas totalement renversé l'influx stimulé par ces deux traitements (figure 4.5.C et 4.5.D), indiquant donc que ces canaux ne sont pas impliqués de façon majeure. En revanche, une pré-incubation des cellules U2OS avec un inhibiteur des canaux TRPV1, le SB-366791, a prévenu complètement l'influx calcique, ce qui suggère l'activation des canaux TRPV1 par la PTH et la forskoline (figure 4.5.E et 4.5.F). Cependant, il faut tout de même noter une légère diminution de l'influx de calcium lorsque les cellules sont pré-incubées avec le RN-1734 (figure 4.5.C et 4.5.D), traduisant alors une implication partielle des canaux TRPV4 dans de l'entrée calcique stimulée par la PTH et la forskoline. Toutefois, il semble clair que le mécanisme principal passe par l'activation des canaux TRPV1.

La sélectivité du SB-366791 a été vérifiée par stimulation des canaux TRPV1 avec un activateur direct, la capsaïcine (données non-présentées). Dans les cellules U2OS, la capsaïcine engendre un influx de calcium qui est renversé par le SB-366791. De plus, la fonctionnalité des canaux TRPV2 et TRPV4 dans ce modèle cellulaire a été aussi confirmée à l'aide d'activateurs directs de ces canaux (données non-présentées).

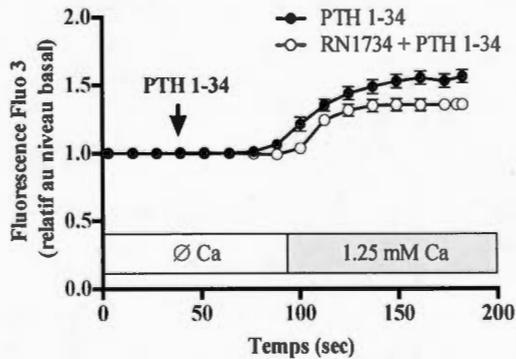
A)



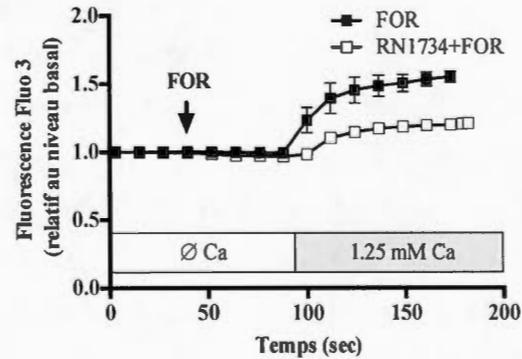
B)



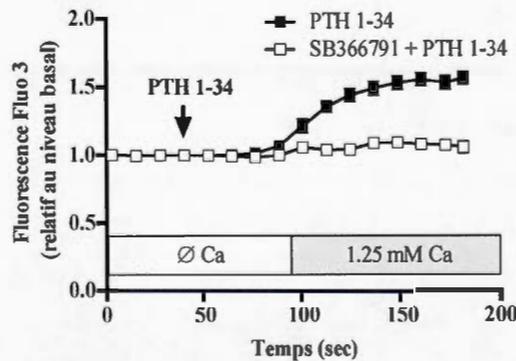
C)



D)



E)



F)

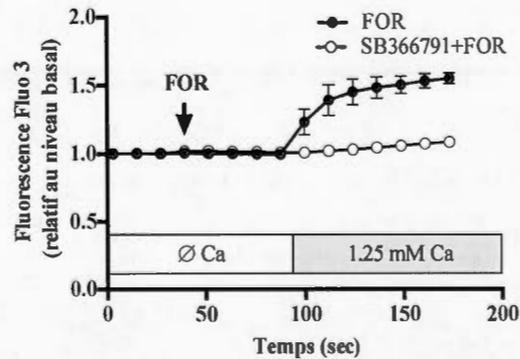


Figure 4.5 Activation des canaux TRPV1 par la PTH et la voie de signalisation associée à l'AMPC dans les cellules U2OS.

Les cellules U2OS ont été marquées avec la sonde fluorescente Fluo-3 sensible au calcium et pré-incubées en présence du tranilast ou TRAN 10 μM (A-B), du RN1734 15 μM (C-D) ou du SB366791 1 μM (E-F) dans du milieu d'incubation sans calcium. Après 5 minutes, de la PTH (1-34) 0,5 μM ou la forskoline 5 μM ont été ajoutés au milieu. Les mesures de calcium intracellulaire ont été effectuées avec un microscope confocal à balayage laser. Le calcium (1,25 mM) a ensuite été ajouté au milieu d'incubation afin d'identifier un influx de calcique. Les valeurs de fluorescence associées au Fluo-3 sont relatives à la fluorescence basale et représentent les moyennes \pm SEM de trois expériences contenant 6 à 7 champs (entre 20 et 30 cellules par champ).

Étant donné que l'AMPc active la PKA (Ohta *et al.*, 2008) et sachant que les canaux TRPV1 possèdent des séquences consensus pouvant être phosphorylées par la PKA (Yao *et al.*, 2005), nous avons évalué l'implication possible de cette kinase dans l'influx de calcium. Une pré-incubation des cellules U2OS avec un inhibiteur de la PKA, le H-89, inhibe l'influx calcique induit par la PTH (figure 4.6.A) et la forskoline (figure 4.6.B). Ces résultats montrent que l'activation de la PKA est impliquée dans l'influx de calcium déclenché par la PTH *via* la voie de signalisation associée à l'AMPc.

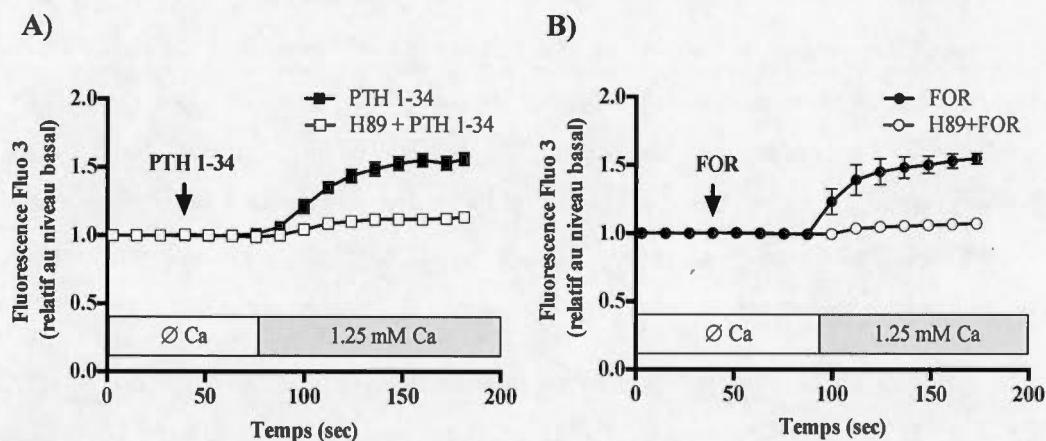


Figure 4.6 Implication de la PKA dans l'influx de calcium induit par la PTH.

Les cellules U2OS ont été marquées avec la sonde fluorescente Fluo-3 sensible au calcium et pré-incubées en présence du H-89 10 μ M dans du milieu d'incubation sans calcium. Après 5 minutes, de la PTH (1-34) 0,5 μ M ou la forskoline 5 μ M ont été ajoutées au milieu. Les mesures de calcium intracellulaires ont été effectuées avec un microscope confocal à balayage laser. Le calcium (1,25 mM) a ensuite été ajouté au milieu d'incubation afin d'identifier un influx calcique. Les valeurs de fluorescence associées au Fluo-3am sont relatives à la fluorescence basale et représentent les moyennes \pm SEM de trois expériences contenant 6 à 7 champs (entre 20 et 30 cellules par champ).

Compte tenu du lien rapporté entre l'AMPc et la migration cellulaire (Howe ; 2004), et de la contribution des canaux TRPV1 dans ce processus (Scwab *et al.*, 2007 ; Komuro et Rakic, 1998 ; Yang et Huang, 2005 ; Rao *et al.*, 2006), nous avons étudié l'effet de la PTH et d'un influx calcique sur la migration des cellules U2OS. Un essai de migration a été réalisé en mesurant le pourcentage de recouvrement d'une surface de culture au cours de 18 heures de traitement (figure 4.7). Les traitements à la PTH (figure 4.7.A) ont stimulé significativement la migration cellulaire de 25,6% ($P > 0,01$). Les inhibiteurs RR et SB366791 ont respectivement inhibé à 38% ($P > 0,05$) et 25,5% ($P > 0,01$) la migration induite par la PTH (figure 4.7.A).

D'autre part, afin de valider le rôle de la voie associée à l'AMPc dans le processus de migration cellulaire, les ostéoblastes ont été traités avec de la forskoline (figure 4.7.B). Contrairement à la PTH, la forskoline n'a pas affecté la migration des cellules. Tel qu'attendu, la présence de RR ou de SB366791 n'ont causé aucune variation de la migration des ostéoblastes car ces deux inhibiteurs seuls n'ont aucun impact significatif sur la migration cellulaire par rapport à la condition contrôle (données non-présentées).

Ces résultats suggèrent que la modulation de la migration des cellules U2OS par la PTH dépend des canaux TRPV1 mais ne semble pas impliquer la voie de signalisation associée à l'AMPc. Ainsi, la PTH stimulerait un influx de Ca en activant TRPV1 et menant à une augmentation de la migration des ostéoblastes, de manière indépendante à une élévation de l'AMPc cellulaire.

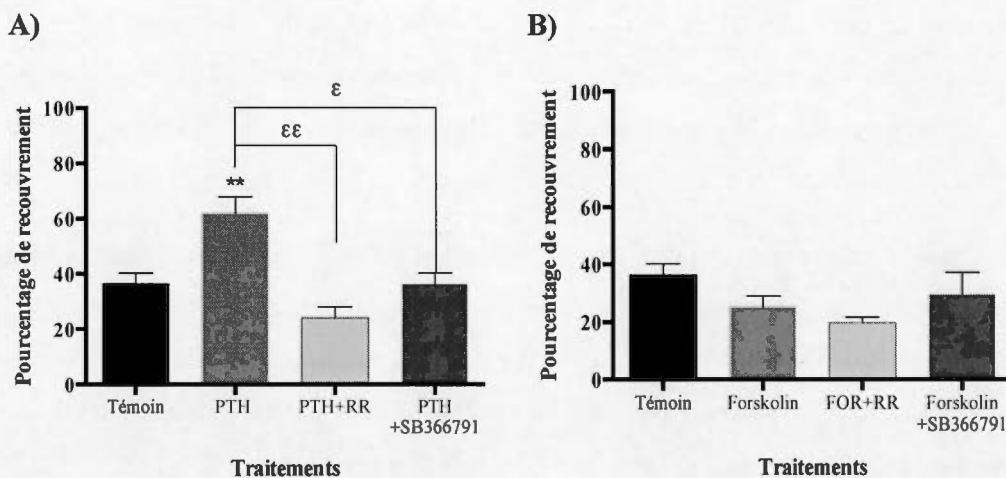


Figure 4.7 Stimulation de la migration des cellules U2OS par la PTH et implication de la voie de signalisation associée à l'AMPC.

Après confluence, une section de la monocouche des cellules U2OS a été enlevée avec la pointe d'un embout et éliminée. Les cellules ont été ensuite incubées avec de la PTH (1-34) 0,5 μ M (A) ou de la forskoline 5 μ M (B) en présence ou en absence de Ruthenium red ou RR 10 μ M ou SB366791 1 μ M (A-B) pendant 18 heures à 37°C et 5% CO₂. Des photos de chaque condition ont été prises toutes les 10 minutes avec un objectif 10X à contraste de phase et une caméra Monochrome Nikon. Les images prises aux différents intervalles ont été superposées afin d'évaluer le pourcentage de cellules ayant migré dans l'espace libre. La surface (en mm²) libre, créée avec l'embout, a ainsi été mesurée grâce au logiciel NIS-element de Nikon. Le pourcentage de recouvrement est obtenu en comparant la surface libre au temps zéro et celle restante après la migration des cellules. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM de quatre expériences. Des analyses statistiques ont été réalisées par ANOVA one way : **P>0,01, stimulation positive par rapport au témoin et ϵ P>0,05 ; $\epsilon\epsilon$ P>0,01, différence significative entre le traitement seul (PTH 1-34 ou forskoline) et avec son inhibiteur (A-B).

Par ailleurs, sachant que les cellules ostéoblastiques migrent au niveau de la lacune de résorption pour ensuite proliférer, nous avons documenté davantage l'effet anabolique de la PTH sur cette dernière fonction cellulaire. Étant donné que le calcium est un second messenger connu pour réguler la division cellulaire (Macrez et

Mironneau, 2004), nous avons étudié l'impact de la stimulation des canaux TRPV1 sur la prolifération des cellules U2OS. Pour ce faire, un essai MTT a été réalisé durant deux jours de traitement avec de la PTH ou de la forskoline en présence ou en absence de l'inhibiteur SB366791 (figure 4.8.A et 4.8.B).

Après 48 heures de traitement, la réduction du MTT a été significativement augmentée par la PTH ou par la forskoline par rapport au témoin ($P > 0,001$), indiquant que la prolifération des cellules est stimulée dans ces conditions (figure 4.8.A et 4.8.B). En présence de l'inhibiteur des canaux TRPV1 (SB366791), une diminution significative de l'activité mitochondriale a été observée aussi bien avec la PTH que la forskoline (figure 4.8.A et 4.8.B ; $P > 0,05$ et $P > 0,01$ respectivement), suggérant que l'influx de calcium véhiculé par TRPV1 est impliqué dans la prolifération des cellules U2OS et implique l'AMPc. De manière intéressante, la présence de SB366791 associée à la PTH et à la forskoline a causé une augmentation significative de l'activité de la succinate déshydrogénase par rapport au témoin (figure 4.8.A et 4.8.B ; $P > 0,05$ et $P > 0,01$ respectivement). En effet, une hausse de l'activité cette enzyme est notée dans les deux cas, ce qui sous-entend que la PTH et la voie associée à la production d'AMPc stimulent d'autres cascades de signalisation, indépendantes de l'activité de TRPV1, menant à la régulation de la prolifération cellulaire. Par ailleurs, une vérification de l'effet du SB366791 seul sur l'activité mitochondriale des cellules a été réalisée, et aucun impact significatif n'a été remarqué par rapport à la condition contrôle (données non-présentées).

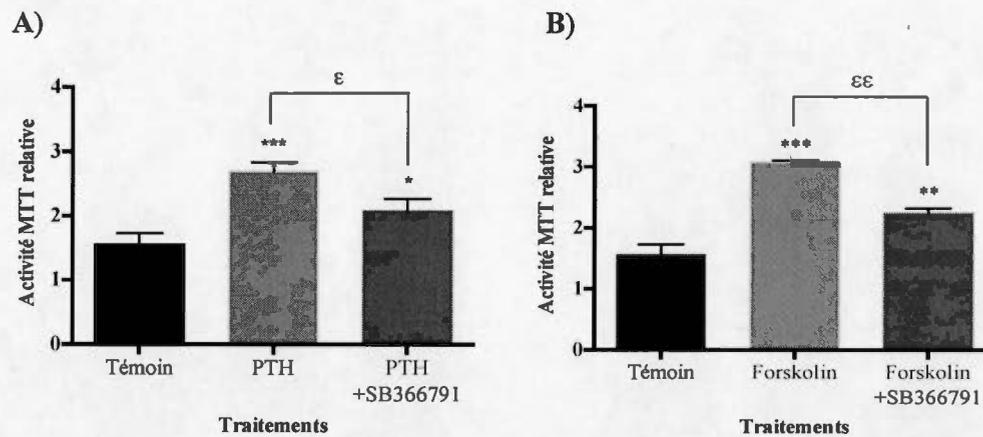


Figure 4.8 Stimulation de la prolifération des cellules U2OS *via* l'ouverture des canaux TRPV1 par la PTH et la voie de signalisation associée à l'AMPC.

Analyse de la prolifération cellulaire par essai MTT. Les cellules U2OS ont été traitées durant 48 heures avec de la PTH (1-34) 0,5 µM (A) ou de la forskoline 5 µM (B) en absence et en présence de SB366791 1 µM. En essai MTT, les cellules ont été incubées une heure et 30 minutes avec le réactif et les cristaux de formazan provenant de la réduction du MTT ont été solubilisés durant 30 minutes dans du DMSO. Par la suite, la densité optique a été lue à une longueur d'onde de 575 nm. Les valeurs sont relatives au jour 0 et exprimées en moyenne \pm SEM de trois expériences. Des analyses statistiques ont été réalisées par ANOVA one way : * $P > 0,05$; ** $P > 0,01$; *** $P > 0,001$, différence significative par rapport au témoin et $\epsilon P > 0,05$; $\epsilon\epsilon P > 0,01$, différence signification entre le traitement seul et avec son inhibiteur (A-B).

CHAPITRE V : DISCUSSION

L'hormone PTH a été approuvée par la « Food and Drug Administration » (FDA) et est commercialisée depuis 2012 sous le nom de Forteo pour le traitement de l'ostéoporose. Il s'agit d'un médicament permettant de favoriser la formation osseuse. L'effet anabolique de la PTH a été relativement bien documenté *in vivo*, mais les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués sont encore méconnus. L'objectif principal de ce projet était donc de caractériser davantage la signalisation engendrée par la PTH, en lien avec le calcium et les canaux calciques, et l'impact que cette dernière a sur les fonctions cellulaires des ostéoblastes, cellules responsables de la formation de l'os. Ainsi, une meilleure compréhension de l'effet anabolique de la PTH au niveau de la cellule pourrait permettre le développement d'une nouvelle cible encore plus efficace pour le traitement de l'ostéoporose. Cette maladie touche chaque année 1,4 millions de canadiens et les frais médicaux associés s'élèvent actuellement à environ deux milliards de dollars. C'est pourquoi mieux documenter le processus de régénération des os et les facteurs impliqués est importante pour la création d'une médication plus efficace pour traiter cette maladie.

5.1 Signalisation de la PTH en lien avec l'influx calcique et la voie de signalisation associée à l'AMPC

Avant d'entreprendre cette étude, nous avons confirmé que les ostéoblastes humains de la lignée U2OS expriment les récepteurs de la PTH. Comme le montre la figure 4.1, les ARNm codant les récepteurs PTH1R et PTH2R ont été détectés. Ceci est en accord avec plusieurs autres études démontrant que PTH1R est fortement exprimé au niveau des os et des reins (Nabanita et *al.*, 2009 ; Schlüter, 1999). Plus précisément, ce récepteur est aussi bien retrouvé au niveau des cellules

ostéoblastiques issues d'un ostéosarcome (Majeska et Rodan, 1982) que des cellules ostéoblastiques « normales » (Partridge et *al.*, 1981). De plus, il a été démontré que l'expression et l'activité de PTH1R augmentent dans les ostéoblastes matures (Suda et *al.*, 1996). Nos résultats sont ainsi confirmés car les cellules de la lignée U2OS sont considérées comme étant des ostéoblastes matures (ATCC). Concernant PTH2R, on rapporté principalement son expression au niveau du pancréas et du cerveau (Usdin et *al.*, 1995). Cependant, l'équipe de Panda et *al.*, (2012) a récemment démontré la présence de PTH2R au niveau des chondrocytes, ce qui laisse supposer que ce récepteur jouerait également un rôle dans le métabolisme osseux, notamment au niveau du développement endochondral de l'os.

Étant donné l'expression des récepteurs de la PTH dans les cellules U2OS, nous avons étudié l'impact de cette hormone sur le flux de calcium dans les ostéoblastes. Pour ce faire, nous avons effectué des mesures de calcium intracellulaire par microscopie confocale. Suite à un traitement des cellules à la PTH, aucune variation de la fluorescence n'est observée en absence de calcium dans le milieu (figure 4.2.A), ce qui permet de conclure que la PTH n'induit pas de mobilisation de calcium venant des réserves intracellulaires telles que le réticulum endoplasmique. Cela nous permet donc d'exclure l'implication de la voie de signalisation associée à la phospholipase C et la production d'IP₃ (Kadamur et Ross, 2013). En revanche, lorsque l'on ajoute du calcium dans le milieu, une augmentation de la fluorescence des cellules d'environ 1.5 est remarquée (figure 4.2.A), traduisant alors un influx de calcium à l'intérieur des ostéoblastes (Yamaguchi et *al.*, 1987). Ce résultat suggère donc la présence de canaux calciques à la membrane plasmique des cellules U2OS permettant l'entrée de calcium extracellulaire dans ces dernières. De plus, ces canaux semble être activés par la PTH.

Afin d'identifier le récepteur impliqué dans l'influx de calcium PTH-dépendant dans les cellules U2OS, nous avons utilisé le polypeptide PTHrP, qui se fixe spécifiquement à PTH1R (Schlüter, 1999). Telle la PTH, PTHrP a conduit à une

hausse de la fluorescence cellulaire exclusivement en présence de calcium dans le milieu (figure 4.2.B), confirmant la stimulation de l'influx calcique dans les ostéoblastes. L'effet était comparable à celui de la PTH, c'est-à-dire, d'environ 1,5 par rapport à la condition basale. Cette expérience nous amène à conclure que la PTH se fixe à PTH1R lorsqu'elle induit un influx calcique dans les cellules U2OS, et cette conclusion est en accord avec la modulation du métabolisme du calcium et du phosphate par la PTH *via* PTH1R (Usdin et *al.*, 1995).

Une fois l'implication de la voie de signalisation associée à la phospholipase C et IP₃ exclue dans l'effet de la PTH sur le calcium, nous avons étudié le rôle de la cascade de signalisation reliée à la production d'AMPc. Ainsi, les cellules ont été mises en présence de la forskoline, un activateur direct de l'adénylate cyclase, pour augmenter la concentration intracellulaire en AMPc. Tout comme le traitement avec la PTH, la forskoline a conduit à une hausse de la fluorescence des cellules d'environ 1.5 fois, indiquant un influx calcique (figure 4.2.C). Ceci signifie que la sous-unité G α s est activée et entraîne la production d'AMPc (Neer, 1995 ; Gilman, 1987). L'activation par la PTH semble donc permettre l'ouverture de canaux présents à la membrane et l'entrée de calcium dans les ostéoblastes (Yamaguchi et *al.*, 1987 ; de Groot et *al.*, 2009).

5.2 Implication des canaux TRPV1 dans l'influx calcique stimulé par la PTH

Bien que les résultats de Yamaguchi et *al.*, (1987) démontrent une modulation de la concentration intracellulaire de calcium par la PTH *via* la voie de signalisation associée à l'AMPc dans un modèle d'ostéoblastes de rat, ils n'ont pas identifié les canaux impliqués. Les deux grandes familles de canaux pouvant être impliquées sont les VDCC et les TRP (Parekh et Penner, 1997). Des résultats non publiés de notre laboratoire nous ont permis d'exclure l'implication des canaux VDCC et de concentrer notre étude sur les canaux TRP. Dans ce but, nous avons eu une approche

pharmacologique, en utilisant des inhibiteurs sélectifs des canaux. Comme le montre la figure 4.3, une pré-incubation des cellules avec le RR inhibe l'influx calcique engendré par la PTH (figure 4.3.A) et la forskoline (figure 4.3.B), confirmant l'implication des canaux de la famille TRPV dans la modulation du calcium. Ces canaux sont exprimés dans plusieurs types de cellules tels que les cellules osseuses, rénales, épithéliales (Wu et *al.*, 2010; de Groot et *al.*, 2009), ce qui appuie notre résultat.

La famille des canaux TRPV se compose de 6 membres (Clapham et *al.*, 2005), nous avons évalué leur expression génique dans notre modèle cellulaire par PCR. Tel que montré dans la figure 4.4, les résultats confirment l'expression de TRPV1, TRPV2 et TRPV4 dans les cellules U2O2. L'absence de TRPV6 dans ce modèle cellulaire a été déjà rapporté dans les travaux de Abed et *al.*, (2009). Par ailleurs, cette équipe confirme la présence de TRPV2 et TRPV4 ainsi que l'absence de TRPV5 dans cette lignée cellulaire. Cependant, ils n'ont pas répertorié la présence de TRPV1. La présence de TRPV1 au niveau des ostéoblastes a été démontrée *in vivo* par Idris et *al.*, 2010. Il serait donc important de caractériser le niveau protéique de TRPV1 dans les cellules U2OS par immunobuvardage.

Par la suite, en utilisant des inhibiteurs sélectifs de TRPV1, de TRPV2 et de TRPV4 nous avons identifié TRPV1 comme étant responsable de l'influx calcique induit par la PTH. Tel que présenté à la figure 4.5.E-F, l'utilisation du SB366791, un inhibiteur des TRPV1, entraîne un blocage complet de l'influx de calcium stimulé par la PTH et la forskoline (figure 4.5.E-F). Le fait qu'une pré-incubation avec du Tranilast ne renverse pas l'influx calcique engendré par la PTH et la forskoline nous a permis d'exclure l'implication de TRPV2 (Figure 4.5.A-B). Un traitement avec le RN1734 n'est pas capable d'inhiber complètement l'influx de calcium observé suite à une stimulation avec l'hormone et l'activateur de l'adénylate cyclase (figure 4.5.C-D). Toutefois, la légère inhibition remarquée peut se traduire par une implication partielle des canaux TRPV4 dans l'entrée calcique stimulée par la PTH et la

forskoline. Cependant, il semble clair que le mécanisme principal passe par l'activation des canaux TRPV1. Une hypothèse envisageable, mais non vérifiée, serait que la PTH active préférentiellement TRPV1 lorsque les deux canaux sont exprimés dans les cellules. Notre étude est la première à rapporter la stimulation de l'entrée calcique par la PTH dans les ostéoblastes *via* les canaux TRPV1. L'équipe de de Groot et *al.*, (2009) a effectué des travaux similaires sur les cellules rénales. Ils ont montré que la PTH induisait un influx calcique *via* la voie de signalisation associée à l'AMPC et l'activation des canaux TRPV5.

5.3 Rôle de la PKA dans l'activation des canaux TRPV1 induit par la PTH

Au vu de ces résultats nous avons documenté davantage le mécanisme de signalisation par lequel la PTH stimule l'influx calcique *via* TRPV1. Il est connu que la voie majeure de transduction de la PTH est associée à l'activation de la PKA (Swarthout et *al.*, 2002). L'utilisation de H-89, un inhibiteur de la PKA, nous a permis de bloquer l'influx induit par la PTH (figure 4.6.A) et la forskoline (figure 4.6.B), confirmant ainsi que la stimulation par la PTH active l'adénylate cyclase, menant à la production d'AMPC et à l'activation de la PKA (Simonds, 1999). Cette activation a pour conséquence une entrée de calcium véhiculée par les canaux TRPV1, suggérant alors que cette kinase joue un rôle dans l'ouverture de ces canaux calciques. Cette conclusion serait en accord avec les résultats de de Groot et *al.*, (2009) qui stipulent que l'activation de la PKA par la PTH entraîne la phosphorylation d'une thréonine du canal TRPV5, permettant son ouverture. Comme expliqué dans l'état des connaissances, tous les canaux TRPV possèdent des séquences consensus de phosphorylation pouvant mener à leur régulation (Yao et *al.*, 2005). Les TRPV1 pourraient être phosphorylés au niveau de la sérine⁵⁰², de la sérine¹¹⁶ et de la thréonine³⁷⁰. Une phosphorylation d'un de ces résidus peut aussi bien potentialiser la réponse à un activateur de TRPV1 (i.e. chaleur, capsaïcine), que

réduire la désensibilisation du canal pour augmenter son efficacité dans le temps (Rathlee *et al.*, 2002 ; Lopshire et Nicol, 1998 ; Bhave *et al.*, 2002 ; Mohapatra et Nau, 2005). Ainsi, on peut penser que la phosphorylation de la sérine⁵⁰² suite à une stimulation par la PTH entraînerait l'ouverture des canaux TRPV1 dans les ostéoblastes. Pour vérifier cette hypothèse et compléter cette étude, il faudrait tout d'abord réaliser une immunoprécipitation de TRPV1 suivie d'une immunodétection des résidus sérine/thréonine phosphorylés, puis confirmer le site de phosphorylation par spectrométrie de masse.

Par ailleurs, de plus en plus d'évidences montrent que l'activité de la PKA est modulée par des protéines d'échafaudage « a-kinase anchor protein » (AKAP). En effet, il a été démontré que ces protéines s'associent avec la PKA et assurent une proximité entre la PKA et ses protéines cibles (Colledge *et al.*, 2000 ; Fraser et Scott, 1999). Dans les cellules humaines, les protéines AKAP79 sont constituées de trois régions polybasiques non contigües qui leur donnent la capacité de se fixer aux phospholipides membranaires (Dell'Acqua *et al.*, 1998). Ainsi, cette localisation cellulaire suggère que ce complexe peut réguler le niveau de phosphorylation et donc l'activité de certaines protéines transmembranaires telles que les canaux ioniques (Fraser et Scott, 1999). En effet, plusieurs équipes (Zhang et McNaughton, 2008 ; Schnizler *et al.*, 2008 ; Jeske *et al.*, 2008) ont montré la formation d'un complexe entre AKAP79/150 et PKA. Cette liaison permettrait la sensibilisation et l'activation du canal au niveau neuronal. Par ailleurs, les travaux de Fan *et al.*, 2009 ont montré que lorsque des cellules HEK193 sont transfectées avec AKAP79, une nette augmentation de la phosphorylation du canal TRPV4 (i.e. sérine⁸²⁴) est observée suite à la stimulation avec la forskoline.

Il semble clair qu'au niveau des neurones, la PKA phosphoryle et active les canaux TRPV1 et ce *via* les protéines AKAP. Il serait tout à fait plausible que ce processus se produise également dans les ostéoblastes humains. Pour ce faire, il serait

nécessaire de confirmer le lien entre AKAP79 et PKA dans la phosphorylation de TRPV1 avec une immuno-précipitation suivie d'un immuno-buvardage. Et enfin, il faudrait vérifier si la phosphorylation de TRPV1 par PKA est dépendante d'AKAP79/150 en diminuant son expression grâce à une approche de silence génique par siRNA.

5.4 Modulation de la migration des ostéoblastes par la PTH *via* l'activation des canaux TRPV1

Les résultats précédents rapportent que la stimulation par la PTH mène à un influx calcique véhiculé par les canaux TRPV1 et cette stimulation semble dépendre de la voie de signalisation associée à la production d'AMPC et à l'activation de la PKA. La question qui se pose alors est : quel est l'impact de cet influx de calcium au niveau des fonctions ostéoblastiques?

Puisqu'il a été proposé que les canaux cationiques mécano-sensitifs pouvaient jouer un rôle important dans la régulation intracellulaire de calcium et la migration des cellules (Lee *et al.*, 1999), nous avons traité les cellules U2OS avec la PTH ou la forskoline conjointement avec les différents inhibiteurs de canaux calciques (figure 4.7). Le pourcentage de recouvrement a été évalué durant 18 heures. Le traitement avec la PTH seule augmente de 25,6% ($P > 0,01$) la migration des cellules et cette stimulation est renversée ($P > 0,01$) par la présence d'un inhibiteur sélectif de la famille des canaux TRPV, le RR. Pareillement, l'utilisation de l'inhibiteur de TRPV1, le SB366791, permet d'inhiber de 25,5% ($P > 0,05$) la migration des ostéoblastes observée suite au traitement à la PTH seule (figure 4.7.A). Ainsi, lorsqu'on inhibe l'entrée de calcium dans les cellules ostéoblastiques, on ramène la migration cellulaire à un niveau basal comparable à la condition témoin. Ceci nous permet de conclure qu'en stimulant les canaux TRPV1 et l'entrée de calcium dans les ostéoblastes, la PTH augmente la migration ostéoblastique. Actuellement, il n'existe

pas de travaux démontrant un lien entre les canaux TRPV1 et la migration ostéoblastique. Cependant, quelques études ont été menées sur des cellules artérielles pulmonaires (Martin *et al.*, 2012), des hépatocytes (Waning *et al.*, 2006) et des neurones (Goswami *et al.*, 2006). Bien qu'une corrélation soit observée entre l'entrée de calcium *via* TRPV1 dans ces différentes cellules et une modulation de la migration, le mécanisme impliqué est encore méconnu. Les travaux de Goswami *et al.*, (2006) indiquent qu'en présence de calcium la partie C-terminale de TRPV1 peut interagir avec les microtubules, et ainsi les stabiliser. La cellule peut alors s'étendre dans cette région et initier sa migration. D'autre part, l'équipe de Martin *et al.* (2012) montre que dans les cellules PASM (Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells), l'activation de TRPV1 est corrélée avec une augmentation d'expression de la vimentine, une protéine faisant partie de la famille des filaments intermédiaires qui constituent une partie du cytosquelette des cellules. Ainsi, ces deux pistes seraient à explorer dans le cadre de notre étude sur les cellules U2OS.

Il a également été rapporté que l'entrée de calcium *via* TRPV1 mène à l'activation de facteurs de transcription tels que NFAT et CREB qui stimulent l'expression de gènes impliqués dans la migration des cellules (Tran *et al.*, 1999). Les hypothèses liant les canaux TRPV1 et la migration sont donc nombreuses et concernent plusieurs compartiments cellulaires. Ainsi, nous pouvons penser que l'augmentation de calcium intracellulaire provoquée par la PTH et TRPV1 induit plusieurs cascades menant à la migration des ostéoblastes. Dans notre cas, il serait intéressant d'évaluer l'expression de la vimentine et d'autres gènes clés par PCR. Par exemple, les gènes codant pour l'actine, la myosine et l'intégrine $\beta 4$.

Bien qu'il existe une certaine dichotomie concernant le rôle de la PKA dans la migration cellulaire, il est bien connu que la production d'AMPc et l'activation de cette kinase jouent un rôle important dans la réorganisation du cytosquelette et donc dans la migration des cellules (Howe, 2004). Étrangement, lorsque les cellules U2OS

ont été traitées avec de la forskoline, aucun impact significatif n'a été observé sur la migration (figure 4.7.B). Étant donné que nous avons travaillé avec de la PTH (1-34) qui, comme expliqué précédemment, stimule la voie de signalisation associée à l'AMPC, nous pouvons exclure l'hypothèse de l'activation de la voie associée à la PLC. Bien que simpliste et non scientifique, l'hypothèse la plus plausible serait que le stock de forskoline utilisé était trop vieux et aurait été congelé-décongelé de trop nombreuses fois. Il faudrait donc recommencer cette expérience avec un nouveau stock de forskoline afin de confirmer ces résultats. Un siRNA contre la kinase PKA serait également à considérer. Une autre hypothèse qui pourrait être suggérée est que la PTH stimulerait un influx de Ca en activant TRPV1, permettant alors une augmentation de la migration des ostéoblastes et ce de manière indépendante à une élévation du taux d'AMPC cellulaire. Cette dernière hypothèse est peu probable étant donné que la PTH utilisée est la PTH (1-34) donc un peptide « conçu » pour activer la voie de signalisation associée à l'AMPC et la PKA (Takasu *et al.*, 1999).

5.5 Régulation de la prolifération ostéoblastique par les canaux TRPV1 et la PTH

Comme expliqué auparavant, suite à la résorption osseuse, les ostéoblastes migrent dans la lacune, prolifèrent et se différencient (Hadjidakis et Andoulakis, 2006). Ces trois fonctions cellulaires sont considérées comme essentielles à la formation des os, d'où l'intérêt de les étudier. De plus, étant donné l'importance du calcium dans la modulation de ces fonctions (Macrez et Mironneau, 2004), nous avons initié des expériences préliminaires pour déterminer un indice de prolifération des cellules U2OS suite à une stimulation des canaux TRPV1 par la PTH. Comme le montre la figure 4.8, l'activité mitochondriale des cellules est augmentée significativement en présence de PTH (figure 4.8.A ; $P > 0,001$) ou de la forskoline (figure 4.8.B ; $P > 0,001$). Celle-ci est généralement reliée au nombre de cellules dans

les puits et par conséquent à leur viabilité. Néanmoins, les cellules ont été ensemencées à faible densité et traitées trois jours plus tard (i.e. temps nécessaire à leur adhésion et aux protéines pour être pleinement fonctionnelles après l'utilisation de trypsine), et les résultats obtenus ont été comparés avec l'activité initiale. On peut donc dire que ce test représente un bon indicateur de la croissance des cellules dans ce cas-ci. Ainsi nous pouvons conclure que la PTH permet la croissance des cellules *via* une voie de signalisation associée à l'AMPc (MacDonald et *al.*, 1986).

En présence de l'inhibiteur SB366791, une diminution significative de la prolifération est observée par rapport aux traitements à la PTH (figure 4.8.A ; $P > 0,05$) ou à la forskoline (figure 4.8.B ; $P > 0,01$). Ceci signifie qu'un blocage de l'influx calcique normalement engendré par ces deux traitements ralentit la croissance des ostéoblastes, confirmant alors un rôle du calcium et des canaux TRPV1 dans la régulation de la division cellulaire. Une fois de plus, aucune étude n'a encore été publiée sur l'implication des canaux TRPV1 dans la prolifération des ostéoblastes. Toutefois, Zhao et *al.*, (2014) ont traité des cellules des voies aériennes avec de la capsaïcine, un activateur direct de TRPV1, et ont pu constater une augmentation de l'activité de la succinate déshydrogénase, tout comme nous, corrélée à une augmentation du pourcentage de cellules présent en phase S/G2M du cycle cellulaire. Le tout étant renversé par un inhibiteur de TRPV1, la capsazepine. De plus, les travaux de Takahashi et *al.*, (2014) indiquent qu'un traitement avec la capsaïcine des cellules épithéliales gingivales permet la stimulation de l'expression de gènes cibles tels que le « *fibroblast growth factor 17* » (*FGF17*), connu pour réguler la croissance cellulaire. Ce facteur est aussi exprimé au niveau osseux (Xu et *al.*,), on peut donc supposer qu'après une stimulation par la PTH, l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium induirait l'expression de gènes tels que *FGF17* favorisant alors la prolifération. Ainsi, bien que réalisées sur des modèles différents, ces deux études semblent appuyer nos résultats préliminaires.

Par ailleurs, on remarque que même si la croissance cellulaire est ralentie en présence de l'inhibiteur des canaux TRPV1, elle n'est pas totalement inhibée (figure 4.8.A-B ; $P > 0,05$ en présence de la PTH- $P > 0,01$ en présence de la forskoline). Ce résultat suggère que le blocage de TRPV1 ne suffit pas à renverser complètement l'effet stimulateur de la PTH ou de la forskoline. Cette observation peut s'expliquer par le fait que l'effet anabolique de la PTH sur la prolifération des ostéoblastes ne dépend exclusivement de l'induction d'un influx de calcium dans la cellule. En effet, des études ont déjà documenté que la PTH avait un impact bénéfique sur la prolifération des ostéoblastes (Pettway et *al.*, 2008) en activant la PKA qui peut phosphoryler des facteurs de transcription tels que « cAMP response element-binding protein » (CREB) responsables de la régulation de l'expression de gènes clés impliqués dans la prolifération cellulaire. On fait ici référence aux gènes *C-FOS* ou *C-JUN* (Pearman et *al.*, 1996 ; Clohisy et *al.*, 1992). Ainsi, nous supposons que l'augmentation « résiduelle » de la prolifération ostéoblastique est indépendante des canaux TRPV1 et due à d'autres cascades cellulaires déclenchées par l'effet anabolique de cette hormone.

Il serait important de compléter cette étude en commençant par répéter l'expérience avec l'inhibiteur de la PKA, le H-89, afin de confirmer l'implication de cette kinase dans le mécanisme. Ensuite, il faudrait analyser le cycle cellulaire des U2OS par cytofluorométrie en flux (marquage à l'iodure de propidium) pour voir si on obtient bien une élévation du pourcentage de cellule en phase S/G2M lorsqu'elles sont soumises à un traitement à la PTH ou à la forskoline et que cet effet est renversé en présence des différents inhibiteurs.

CHAPITRE VI : CONCLUSION

La perte de la masse osseuse associée à l'âge compromet bien souvent les fonctions de l'os. Ainsi ce projet visait à accroître les connaissances des mécanismes de signalisation reliés à l'effet ostéoblastique de la PTH et à démontrer le rôle des canaux TRPV1 dans la régulation des fonctions ostéoblastiques *in vitro*. En effet, malgré son utilisation pour traiter l'ostéoporose, les mécanismes cellulaires associés à l'effet anabolique de la PTH au niveau des ostéoblastes sont méconnus. Plus précisément, son impact impliquant le calcium doit encore être mieux compris. Nos travaux ont démontré que la PTH stimule un influx de calcium dans les cellules ostéoblastiques U2OS, un processus qui dépend de la voie de signalisation associée à l'AMPC et à l'activation de la PKA. Par ailleurs, la prolifération des cellules U2OS est augmentée par la PTH *via* la voie de l'AMPC et semble impliquer les canaux TRPV1. Pour finir, l'ouverture de ces canaux semble également réguler de manière positive la migration des ostéoblastes, bien que ce processus semble indépendant de la voie de signalisation associée à la production d'AMPC et à l'activation de la PKA.

Ces canaux pourraient alors constituer une nouvelle cible pour augmenter la formation et la régénération du tissu osseux de manière plus efficace, et ce en modulant l'amplitude et la durée de l'influx de calcium médié par TRPV1 (ex : analogue de la PTH plus efficace).

D'autres expériences sont nécessaires afin de documenter la voie de signalisation associée à l'effet anabolique de la PTH ainsi que son impact sur les canaux et les fonctions ostéoblastiques. Notamment, il serait important d'effectuer des immunobuvardages afin d'estimer l'abondance des canaux TRPV1, TRPV2 et TRPV4 dans les ostéoblastes humains. De plus, il serait intéressant d'étudier plus en profondeur l'activation des canaux TRPV1 par la PTH en réalisant une

immunoprécipitation des TRPV1 suivie d'une immunodétection des résidus sérine/thréonine phosphorylés. Par ailleurs, les études sur l'effet anabolique de la PTH montrent principalement une augmentation de la différenciation des ostéoblastes, alors capables de reformer l'os et de le minéraliser (Cranney *et al.*, 2006). Afin de compléter ce volet de recherche, un essai de différenciation par dosage de l'activité enzymatique ALP devrait être réalisé et confirmé par l'évaluation de l'expression de marqueurs de différenciation tels que le collagène de type I ou l'ostéocalcine. Par la suite, il serait nécessaire de reproduire ces résultats sur des cultures primaires d'ostéoblastes humains pour voir si les résultats sont les mêmes que sur la lignée cellulaire. Il faudrait également valider ces données par l'utilisation de siRNA ou shRNA. Enfin, il faudrait déterminer l'influence de la PTH et des canaux TRPV1 sur la formation osseuse *in vivo*, à l'aide d'un élevage de souris de type sauvage et déficiente pour le gène *TRPV1*.

BIBLIOGRAPHIE

- ABED, E., D. Labelle, C. Martineau, A. Loghin, R. Moreau. 2009. Expression of transient receptor potential (TRP) channels in human and murine osteoblast-like cells. *Molecular Membrane Biology*, page 1-13.
- ALDER, C. P. 2000. Bones and bone tissue ; normal anatomy and histology. In *bone Disease*, 1-30. Springer-Verlag. New York.
- BEVAN, S., T. Quallo, D.A. Anderson. 2014. Mammalian Transient Receptor Potentiel (TRP) Cation Channels – Chapter : TRPV1. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 222, 207-245.
- BHAVE, G., H. Hu, K.S. Glauner, W. Zhu, H. Wang, D.J. Brasier, G.S. Oxford, R.W. Gereau 4th. 2003. Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 12480-12485.
- BHAVE, G., W. Zhu, H. Wang, H. Hu, D.J. Brasier, G.S. Oxford, R.W. Gereau 4th. 2002. cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron*, 35, 721-731.
- BIANCO, P., M. Riminucci, S. Gronthos, et al. 2001. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*, 19, 180–192.
- BIRDER, L.A., Y. Nakamura, S. Kiss, M.L. Nealen, S. Barrick, A.J. Kanai, E. Wang, G. Ruiz, W.C. De Groat, G. Apodaca, et al. 2002. Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1. *Nat Neurosci*, 5, 856–860.

- BÖLCSKEI, K., Z. Helyes., A. Szabo., K. Sandor., K. Elekes, J. Nemeth., R. Almasi., E. Pinter., G. Petho., J. Szolcsanyi. 2005. Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain*, 117, 368–376.
- BOURINET, E., C. Altier, M.E. Hildebrand, T. Tuang, M.W. Salter, G.W. Zamponi. 2014. Calcium-Permeable Ion Channels in Pain Signaling. *American Physiological Society*, 94, 1, 81-140.
- BROWN, E. M., R. J. MacLeod. 2001. Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol Rev*, 81, 239–97.
- CARTER, P. H., M. Shimizu, T. J. Gardella. 1999. The hydrophobic residue phenylalanine 184 and leucine 187 in the type-1 parathyroid hormone (PTH) receptor functionally interact with the amino-terminal portion of PTH-(1-34). *J Biol Chem*, 274, 45, 31955-31960.
- CATERINA, M.J, A. Leffler, A.B. Malmberg, W.J. Martin., J. Trafton, K.R. Petersen-Zeitz, M. Koltzenburg, A.I. Basbaum, D. Julius. 2000. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*, 288, 306–313.
- CATERINA, M.J., M.A. Schumacher, M. Tominaga, T.A. Rosen, J.D. Levine, D. Julius. 1997. The capsaicin receptor : a heat-activated ion channel in pain pathway. *Nature*, 389, 816-824.
- CHOMCCYNSKI, P., N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162, 156-159.
- CLAPHAM, D. E., D. Julius, C. Montell, G. Schultz. 2005. International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev*, 57, 427–450.

- COLLEDGE, M., R. A. Dean, G. K. Scott, L. K. Langeberg, R. L. Huganir, J. D. Scott. 2000. Targeting of PKA to glutamate receptors through a MAGUK-AKAP complex. *Neuron*, 27, 1, 107–19.
- CRANNEY, A., A. Papaioannou, N. Zytaruk, D. Hanley, J. Adachi, D. Goltzman, T. Murray and A. Hodsmann. 2006. Parathyroid hormone for the treatment of osteoporosis: a systematic review. *CMAJ*, 175, 1, 52-59.
- CHU, C.J., S.M. Huang, L. De Petrocellis, T. Bisogno, S.A. Ewing, J.D. Miller, R.E. Zipkin, N. Daddario, G. Appendino, V. Di Marzo, et al. 2003. N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia. *J Biol Chem*, 278, 13633-13639.
- DAVIES, J., J. Warwick, N. Totty, et al. 1989. The osteoclast functional antigen, implicated in the regulation of bone resorption, is biochemically related to the vitronectin receptor. *J. Cell Biol.* 109, 1817-1826.
- DAVIS, J.B, J. Gray, M.J. Gunthorpe, J.P. Hatcher, P.T. Davey, P. Overend, M.H. Harries, J. Latcham, C. Clapham, K. Atkinson, et al. 2000. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*, 405, 183–187.
- DE GROOT, T., K. Lee, M. Langeslag, Q. Xi, K. Jalink, R. J. Bindels and J. G. Hoenderop. 2009. Parathyroid hormone activates TRPV5 via PKA-dependent phosphorylation. *J Am Soc Nephrol*, 20, 8, 1693-1704.
- DE PETROCELLIS, L., S. Harrison, T. Bisogno, M. Tognetto, I. Brandi, G.D. Smith, C. Creminon, J.B. Davis, P. Geppetti, V. Di Marzo. 2001. The vanilloid receptor (VR1)-mediated effects of anandamide are potently enhanced by the cAMP-dependent protein kinase. *J Neurochem*, 77, 1660-1663.

- DE SOUZA, N.J, Dohadwalla, A.N., Reden, J. 1983. *Forskolin : A Labdane Diterpenoid with Antihypertensive, Positive Inotropic, Platelet Aggregation Inhibitory, and Adenylate Cyclase Activating Properties*. Medicinal Research Reviews, 3, 2, 201-219.
- DEAL, C. 2009. Potential new drug targets for osteoporosis. Nature Clinical Practice Rheumatology, 5, 20-27.
- DELL'ACQUA, M. L., M.C. Faux, J. Thorburn, A. Thorburn, J. D. Scott. 1998. Membrane targeting sequences on AKAP79 bind phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate. EMBO J, 17, 2246–2260.
- DENDA, S., M. Denda, K. Inoue, T. Hibino. 2010. Glycolic acid induces keratinocytes proliferation in a skin equivalent model via TRPV1 activation. J Dermatol Sci, 57, 2, 108-113.
- DOCHERTY, R.J., J.C. Yeats, S. Bevan, H.W. Boddeke. 1996. Inhibition of calcineurin inhibits the desensitization of capsaicin-evoked currents in cultured dorsal root ganglion neurones from adult rats. Pflugers Arch, 431, 828-837.
- DUCY, P., C. Desbois, B. Boyce, et al. 1996. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. Nature 382, 448-452.
- ELMARDI, A. S., M. V. Katchburian & E. Katchburian. 1990. Electron microscopy of developing calvaria reveals images that suggest that osteoclasts engulf and destroy osteocytes during bone resorption. Calcif. Tissue Int. 46, 239-245.
- FAN, H. C., X. Zhang and P. A. McNaughton. 2009. Activation of the TRPV4 ion channel is enhanced by phosphorylation. J Biol Chem, vol. 284, 41, 27884-27891.
- FAUX, M.C., J. D. Scott. 1996. Molecular glue : kinase anchoring and scaffold proteins. Cell, 70, 8-12.

- FRASER, I.D., J. D. Scott. 1999. Modulation of ion channels : a « current » view of AKAPs. *Neuron*, 23, 423-426.
- FROST, H. M. 1996. Dynamics of bone remodeling. In *Bone Biodynamics*. H. M. Frost, Ed, 315-333. Little Brown. Boston, MA.
- GENNERO, P., P. Moulin, T. Edouard, F. Conte-Auriol. M. T. Tauber, J. P. Salles. 2004. Métabolisme mineral osseux : données récentes et perspectives relatives à l'ostéogenèse. *Archives de Pédiatrie*, 11, issue 12, 1473-1483.
- GEPPETTI, P., S. Materazzi., P. Nicoletti. 2006. The transient receptor potential vanilloid 1: role in airway inflammation and disease. *Eur J Pharmacol*, 533, 207-214.
- GILMAN, A. G. 1987. G proteins ; transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem*, 56, 615-649.
- GOSWAMI, C., M. Dreger, H. Otto, B. Schwappach, F. Hucho. 2006. Rapid disassembly of dynamic microtubules upon activation of the capsaicin receptor TRPV1. *J. Neurochem*, 96, 254-266.
- HADJIDAKIS, D. J. and Andoulakis. I. I. 2006. Bone remodeling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1092, p. 385-396.
- HOCK, J. M. 2001. *Anabolic actions of PTH in the skeletons of animals*. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2,1, 33-47.
- HOFBAUER, L.C. & M. Schoppet. 2004. Clinical implications of the osteoprotegerin/ RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA*, 292, 490-495.
- HOFMANN, N.A., S. Barth, M. Waldeck-Weiermair, C. Klec, D. Strunk, R. Malli, W.F. Graier. 2014. TRPV1 mediates cellular uptake of anandamide and thus promotes endothelial cell proliferation and network-formation. *Biol Open*, 3, 12, 1164-1172.

- HOFSTETTER, W., A. Wetterwald, M.C. Cecchini, et al. 1992. Detection of transcripts for the receptor for macrophage colony-stimulating factor, c-fms, in murine osteoclasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 9637-9641.
- HSU, H., D. L. Lacey, C.R. Dunstan, et al. 1999. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 3540-3545.
- HUANG, S.M., T. Bisogno, M. Trevisani, A. Al-Hayani, L. De Petrocellis, F. Fezza., M. Tognetto, T.J. Petros, J.F. Krey, C.J. Chu, et al. 2002. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 8400-8405.
- HWANG, S.W., H. Cho, J. Kwak, S.Y. Lee, C.J. Kang, J. Jung, S. Cho, K.H. Min, Y.G Suh, D.Kim et al. 2000. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases : endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 6155-6160.
- IDRIS, A, I., E. Landao Bassonga., S. T. Ralston. 2010. The TRPV1 ion channel antagonist capsazepine inhibits osteoclast and osteoblast differentiation in vitro and ovariectomy induced bone loss in vivo. *Bone*, 46, 4, 1089-1099.
- IIDA, T., T. Moriyama, K. Kobata, A. Morita, N. Murayama, S. Hashizume, T. Fushiki, S. Yazawa, T. Watanabe, M. Tominaga. 2003. TRPV1 activation and induction of noiceptive response by a non-pungent capsaicin-like compound, capsiate. *Neuropharmacology*, 44, 958-967.
- JESKE, N.A., A. Diogenes, N.B. Ruparel, J.C. Fehrenbacher, M. Henry, A.N. Akopian, K.M. Hargreaves. 2008. A-Kinase Anchoring Protein Medites TRPV1 Thermal Hyperalgesia through PKA Phosphorylation of TRPV1. *Pain*, 138, 3, 604-616.

- JORDT S.E., M. Tominaga, D. Julius. 2000. Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 8134-8139.
- JUNG, J., J.S. Shin, S.Y. Lee, S.W. Hwang, J. Koo, J. Cho, H. Cho, U. Oh. 2004. Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *J Biol Chem*, 279, 7048-7054.
- KADAMUR, G., E. M. Ross. 2013. Mammalian phospholipase C. *Annu Rev Physiol.*, 75, 127-154.
- KAMEDA, T., H. Mano, T. Yuasa, et al. 1997. Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts. *J. Exp. Med.* 186, 489-495.
- KARAPLIS, A. C., H. M. Kronenberg. 1996. Physiological roles for parathyroid hormone-related protein : lessons from gene knockout mice. *Vitam Horm*, 52, 177-193.
- KASSEM, M., P. J. Marie. 2011. Senescence-associated intrinsic mechanisms of osteoblast dysfunctions. *Aging Cell* 10, 191–197.
- KHOSLA, S., B.L. Riggs. 2005. Pathophysiology of age-related bone loss and osteoporosis. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 34, 1015–1030.
- KOMURO, H., P. Rakic. 1998. Orchestration of neuronal migration by activity of ion channels, neurotransmitter receptors, and intracellular Ca^{2+} fluctuations. *J. Neurobiol*, 37, 110–130.
- KWON, Y., T. Hofmann, C. Montell. 2007. Integration of phosphoinositide- and calmodulin-mediated regulation of TRPC6. *Mol Cell*, 25, 491-503.
- LANYON, L.E. 1993. Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. *Calcif. Tissue Int.* 53 (suppl 1), S102-S106.

- LEE, A., G. Ishihara, B. Oxford, K. Johnson, K. Jacobson. 1999. Regulation of cell movement is mediated by stretch-activated calcium channels. *Nature*, 400, 382-386.
- LEWIS, R. S. 1999. Store-operated calcium channels. *Adv Sacond Messenger Phosphoprotein Res.*, 33, 279-307.
- LIEBEN, L., G. Carmeliet. 2012. The involvement of TRP channels in bone homeostasis. *Frontiers in endocrinology*, 3, 99, 1-9.
- LIPS, P. 2006. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Bio*, 92, 4-8.
- LISHKO, P.V., E. Procko, X. Jin, C.B. Phelps, R. Gaudet. 2007. The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron*, 54, 905– 918.
- LIZOTTE, J. 2012. Stimulation des canaux « Transient Potential Receptor Vallinoid 4 » par la parathormone chez l'ostéoblaste. Université du Québec À Montréal (mémoire), 79.
- LOPSHIRE, J.C., G.D. Nicol. 1998. The cAMP transduction cascade mediates the prostaglandin E₂ enhancement of the capsaicin-elicited current in rat sensory neurons : whole-cell and single channel studies. *J Neurosci*, 18, 6081-6092.
- LUCK, M.D., P.H. Carter, T.J. Gardella. 1999. The (1-14) fragment of parathyroid hormone (PTH) activates intact and amino-terminally truncated PTH-1 receptors. *Mol Endocrinol*, 13, 5, 670-680.
- MACDONALD, B.R., J.A. Gallagher, R.G. Russelle. 1986. Parathyroid hormone stimulates the proliferation of cells derived from human bone. *Endocrinology*, 118, 6, 2445-2449.
- MACREZ, N., J. Mironneau. 2004. Local Ca²⁺ signals in cellular signalling. *Curr Mol Med*, 4, 3, 263-275.

- MAJESKA, R.J., G.A. Rodan. 1982. Alkaline phosphatase inhibition by parathyroid hormone and isoproterenol in a clonal rat osteosarcoma cell line. Possible mediation by cyclic AMP. *Calcif Tissue Int*, 34, 1, 59-66.
- MARIEB, E.N., K. Hoehn. 2005. *Anatomie et physiologie humaines*. 4^{ème} édition publiée par les éditions du Renouveau Pédagogique Inc, 1296.
- MARIE, P.J., M. Kassem. 2011. Extrinsic mechanisms involved in age-related defective bone formation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 96, 600–609.
- MARTIN, E., D. Dahan, G. Cardouat, J. Gillibert-Duplantier, R. Marthan, J.P. Savineau, T. Ducret. 2012. Involvement of TRPV1 and TRPV4 channels in migration of rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *Eur J Physiol*, 464, 261-272.
- MEUNIER, P.J., J.F. Brantus, R. Chapurlat, G. Chevrel, E. Fontanges, E. Vignot. 2005. *L'ostéoporose*. 3^{ème} édition Masson, 227.
- MINKE, B., B. Cook. 2002. TRP channel proteins and signal transduction. *Physiol Rev*, 82, 429–472.
- MISIOROWSKI, W. 2011. *Parathyroid hormone and its analogues molecular mechanisms of action and efficacy in osteoporosis therapy*. *Endokrynol Pol*, 62, 1, 73-78.
- MOHAPATRA, D.P., C. Nau. 2003. Desensitization of capsaicin-activated currents in the vanilloid receptor TRPV1 is decreased by the cyclic AMP-dependent protein kinase pathway. *J Biol Chem*, 278, 50080-50090.
- MOHAPATRA, D.P., C. Nau. 2005. Regulation of Ca²⁺-dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 280, 13424-13432.
- MONTELL, C. 2005. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE*, 272.

- MORELLI, M.B., C. Amantini, M. Nabissi, S. Liberati, C. Cardinali, V. Farfariello, D. Tomassoni, W. Quaglia, A. Piergentili, A. Bonifazi, F. Del Bello, M. Santoni, G. Mammana, L. Servi, A. Filosa, A. Gismondi, G. Santoni. 2014. Cross-talk between alpha1D-adrenoceptors and transient receptor potential vanilloid type 1 triggers prostate cancer cell proliferation. *BMC Cancer*, 14, 921, 1-13.
- MUTGI, K., J. Koo. 2012. Update on the Role of Systemic Vitamin D in Atopic Dermatitis. *Pediatr Dermatol*.
- NABANITA, S., B. Datta et Abdul, Abou-Samra. 2009. PTH and PTHrP Signaling in Osteoblasts. *Cell Signal*, 21, 8, 1245-1254.
- NEER, E.J. 1995. Heterotrimeric G proteins : organizers of transmembrane signals. *Cell*, 80, 2, 249-257.
- NILIUS, B., G. Owsianik, T. Voets, J. A. Peters. 2007. Transient receptor potential channels in disease. *Physiol Rev* 87, 165–217.
- NUMAZAKI, M., T. Tominaga, H. Toyooka, M. Tominaga. 2002. Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase C ϵ and identification of two target serine residues. *J Biol Chem*, 277, 13375-13378.
- OKAZAKI, R., D. Inoue, M. Shibata, M. Saika, S. Kido, H. Ooka, H. Tomiyama, Y. Sakamoto, T. Matsumoto. 2002. Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) alpha or beta. *Endocrinology*, 143, 6, 2349-2356.
- PANDA, D.K., D. Goltzman, A.C. Karaplis. 2012. Defective postnatal endochondral bone development by chondrocyte-specific targeted expression of parathyroid hormone type 2 receptor. *AM J Physiol Endocrinol Metab*, 303, 12, 1489-1501.

- PAREKH, A.B., R. Penner. 1997. Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev.*, 77, 4, 901-930.
- PARTRIDGE, N.C., B.E. Kemp, M.C. Veroni, T.J. Martin. 1981. Activation of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase in normal and malignant bone cells by parathyroid hormone, prostaglandin E₂, and prostacyclin. *Endocrinology*, 108, 1, 220-225.
- PEARMAN, A.T., W.Y. Chou, K.D. Bergman, M.R. Pulumati, N.C. Partridge. 1996. Parathyroid hormone induces c-fos promoter activity in osteoblastic cells through phosphorylated cAMP response element (CRE)-binding to the major CRE. *J Biol Chem*, 271, 41, 25715-25721.
- PETTWAY, G.J., J.A. Meganck, A.J. Koh, E.T. Keller, S.A. Goldstein, L.K. McCauley. 2008. Parathyroid hormone mediates bone growth through the regulation of osteoblast proliferation and differentiation. *Bone*, 42, 4, 806-818.
- PREMKUMAR, L.S., G.P. Ahern. 2000. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature*, 408, 985-990.
- RAGGATT, L.G., N.C. Partridge. 2010. Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. *The journal of biological chemistry*, vol 285, N°33, 25103-25108.
- RAO, J.N., O. Platoshyn, V.A. Golovina, L. Liu, T. Zou, B.S. Marasa, D.J. Turner, J.X. Yuan, J.Y. Wang. 2006. TRPC1 functions as a store-operated Ca²⁺ channel in intestinal epithelial cells and regulates early mucosal restitution after wounding. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*, 290, 782-792.

- RATHLEE, P.K., C. Distler, O. Obreja, W. Neuhuber, G.K. Wang, S.Y. Wang, C. Nau, M. Kress. 2002. PKA/AKAP/VR-1 module : a common link of Gs-mediated signaling to thermal hyperalgesia. *J Neurosci*, 2, 4740-4745.
- REINHOLT, F.P., K. Hultenby, A. Oldberg, et al. 1990. Osteopontin - a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4473-4475.
- RIDLEY, A.J, M.A. Schwartz, K. Burridge, R.A. Firtel, M.H. Ginsberg, G. Borisy, J.T. Parsons, A.R. Horwitz. 2003. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, 302, 1704–1709
- ROHACS, T., B. Nilius. 2007. Regulation of transient receptor potential (TRP) channels by phosphoinositides. *Pflugers Arch*, 455, 157–168.
- RONG, W., K. Hillsley, J.B. Davis, G. Hicks, W.J. Winchester, D. Grundy. 2004. Jejunal afferent nerve sensitivity in wild-type and TRPV1 knockout mice. *J Physiol*, 560, 867–881.
- ROSENBAUM, T., A. Gordon-Shaag, M. Munari, S.E. Gordon. 2004. Ca^{2+} /calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. *J Gen Physiol*, 123, 53–62.
- SANTE CANADA, site internet. [<http://www.hc-sc.gc.ca/hl-vs/iyh-vsv/diseases-maladies/seniors-aines-ost-fra.php>]. Mis à jour en octobre 2007.
- SCHLÜTER, K. D. 1999. PTH and PTHrP : Similar Structures but Different Functions. *New Physiol Sci.*, 14, 243-249.
- SCHNIZLER, K., P.L. Shutov, M.J. Van Kanegan, M.A. Merrill, B. Nichols, G.S. McKnight, S. Strack, J.w. Hell, Y.M. Usachev. 2008. Protein Kinase A Anchoring via AKAP150 Is Essential for TRPV1 Modulation by Forskolin and Prostaglandin E₂ in Mouse Sensory Neurons. *The journal of Neuroscience*, 28, 19, 4904-4917.

- SCHNOKE, M., S.B. Midura, R.J. Midura. 2009. *Parathyroid hormone suppresses osteoblast apoptosis by augmenting DNA repair*. Bone, 45, 3, 590-602.
- SCHWAB, A., V. Nechyporuk-Zloy, A. Fabian, C. Stock. 2007. Cells move when ions and water flow. Pflugers Arch, 453, 421–432.
- SIMONDS, W.F. 1999. G protein regulation of adenylate cyclase. Trends in Pharmacological Sciences, 20, issue 2, 66-73.
- SIMONET, W.S., D.L. Lacey, C.R. Dunstan, et al. 1997. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell, 89, 309–319.
- SMITH, F.D., L.K. Langeberg, J.D. Scott. 2006. The where's and when's of kinase anchoring. Trends Biochem. Sci., 31, 316–323.
- SOOAMPTON, S., J. Manokawinchoke, P. Pavasant. 2013. Transient receptor potential vanilloid-1 regulates osteoprotegerin/RANKL homeostasis in human periodontal ligament cells. J Periodont Res, 48, 22-29.
- SRIVASTAVA, S., G. Toraldo, M.N. Weitzmann, et al. 2001. Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL)-induced JNK activation. J. Biol. Chem. 276, 8836-8840.
- STOCK, K., A. Garthe, F. De Almeida Sassi, R. Glass, S.A. Wolf, H. Kettenmann. 2014. The capsaicin receptor TRPV1 as a novel modulator of neural precursor cell proliferation. Stem Cells, 32, 12, 3183-3195.
- SUDA, N., M.T. Gillespie, K. Traianedes, H. Zhou, P.W. Ho, D.K. Hards, E.H. Allan, T.J. Martin et J.M. Moseley. 1996. Expression of parathyroid hormonelated protein in cells of osteoblast lineage. J Cell Physiol, 166, 1, 94-104.

- SWARTHOUT, J.T., R.C. D'Alonzo, N. Selvamurugan and N.C. Partridge. 2002. Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells. *Gene*, 282, 1-2, 1-17.
- TAKAHASHI, N., Y. Matsuda, H. Yamada, K. Tabeta, T. Nakajima, S. Murakami, K. Yamazaki. 2014. Epithelial TRPV1 signaling accelerates gingival epithelial cell proliferation. *J Dent Res*, 93, 11, 1141-1147.
- TAKASU, H., T.J. Gardella, M.D. Luck, J.T. Potts, F.R. Bringhurst. 1999. Amino-terminal modifications of human parathyroid hormone (PTH) selectively alter phospholipase C signaling via the type 1 PTH receptor : implications for design of signal-specific PTH ligands. *Biochemistry*, 38, 41, 13453-13460.
- TEITELBAUM, S.L. 2000. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289, 1504-1508.
- TOMINAGA, M., M.J. Caterina, A.B. Malmberg, T.A. Rosen, H. Gilbert., K. Skinner, B.E. Raumann, A.I. Basbaum, D. Julius. 1998. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*, 21, 531-543.
- TORTORA, G.J., B. Derrickson. 2009. Principles of anatomy and physiology. Éditions John Wiley and Sons, Inc, 12ème edition, 1279.
- TRAN, P.O., L.E. Hinman, G.M. Unger, P.J. Sammak. 1999. A wound-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase and its transcriptional activation of immediate early genes is important in the regulation of motility. *Exp. Cell. Res.*, 246, 319-326.
- TROUVIN, A.P., V. Goeb. 2010. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin : maintaining the balance to prevent bone loss. *Clin Interv Aging*, 5, 345-354.
- TURNER, H., A. Fleig, A. Stokes, J.P. Kinet, R. Penner. 2003. Discrimination of intracellular calcium store subcompartments using TRPV1 (transient receptor potential channel, vanilloid subfamily member 1) release channel activity. *Biochem J*, 371, 341-350.

- USDIN, T.B., C. Gruber, T.I. Bonner. 1995. Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH2 receptor. *J Biol Chem*, 270, 26, 15455-15458.
- VAANANEN, H.K., H. Zhao, M. Mulari, et al. 2000. The cell biology of osteoclast function. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 3), 377-381.
- VELLANI, V., S. Mappleback, A. Moriondo, J.B. Davis, P.A. McNaughton. 2001. Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J Physiol*, 534, 813-825.
- VRIENS, J., A. Janssens, J. Prenen, B. Nilius, R. Wondergem. 2004. TRPV channels and modulation by hepatocyte growth factor/scatter factor in human hepatoblastoma (HepG2) cells. *Cell Calcium*, 36, 19-28.
- WANING, J., J. Vriens, G. Owsianik, L. Stüwe, S. Mally, A. Fabian, C. Frippiat, B. Nilius, A. Schwab. 2006. A novel function of capsaicin-sensitive TRPV1 channels ; Involvement in cell migration. *Cell Calcium*, 42, 17-25.
- WARD, B.K., A.L. Magnot, J.P. Walsh, T. Ratajczak. 2012. The role of the calcium-sensing receptor in human disease. *Clin Biochem*, 45, 12, 943-953.
- WEINSTEIN, R.S., R.L. Jilka, A.M. Parfitt, et al. 1998. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J. Clin. Invest.* 102, 274-282.
- WONG, W., J.D. Scott. 2004. AKAP signalling complexes : focal points in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 959-970.
- WU, L.J., T.B. Sweet, D.E. Clapham. 2010. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current Progress in the Mammalian TRP Ion Channel Family. *Pharmacological Reviews*, 62, 381-404.
- XU, J., A. Lawshe, C.A. MacArthur, D.M. Ornitz. 1999. Genomic structure, mapping, activity and expression of fibroblast growth factor 17. *Mech Dev*, 83, 1-2, 165-178.

- YAMAGUCHI, A., T. Komori, T. Suda. 2000. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev*, 21, 4, 393-411.
- YANG, S., X.Y. Huang. 2005. Ca²⁺ influx through L-type Ca²⁺ channels controls the trailing tail contraction in growth factor-induced fibroblast cell migration. *J. Biol. Chem*, 280, 27130–27137.
- YAO, X., H.Y. Kwan and Y. Huang. 2005. Regulation of TRP Channels by phosphorylation. *Neuro-Signals*, 14, 273-280.
- YU, F.H., V. Yarov-Yarovoy, G.A. Gutman, W.A Catterall. 2005. Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacol Rev*, 57, 387–395.
- YAMAGUCHI, D.T., T.J. Hahn, A.I. Klein, C.R. Kleeman and S. Muallem. 1987. Parathyroid Hormone-activated Calcium Channels in an Osteoblast-like Clonal Osteosarcoma Cell Line. *The journal of Biological Chemistry*, 262, 16, 7711-7718.
- ZHAO, L.M., H.Y. Kuang., L.X. Zhang., J.Z. Wu., X.L. Chen., X.Y. Zhang., L.J. Ma. 2014. Effect of TRPV1 channel on proliferation and apoptosis of airway smooth muscle cells of rats. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 34, 4, 504-509.
- ZHANG, X., L.Li, P.A. McNaughton. 2008. Proinflammatory mediators modulate the heat-activated ion channel TRPV1 via the scaffolding protein AKAP79/150. *Neuron*, 59, 450–461.
- ZHU, M.X. 2005. Multiple roles of calmodulin and other Ca⁽²⁺⁾-binding proteins in the functional regulation of TRP channels. *Pflugers Arch*, 451, 105–115.
- ZYGMUNT, P.M., J. Petersson, D.A. Andersson, H. Chuang, M. Sorgard, V. Di Marzo, D. Julius, D.E. Högestätt. 1999. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*, 400, 452-457.