UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

RÔLES DU RÉCEPTEUR CD36 DANS LE MÉTABOLISME OSSEUX

THÈSE PRÉSENTÉE COMME EXIGENCE PARTIELLE DU DOCTORAT EN BIOCHIMIE

PAR KEVORKOVA OLHA

OCTOBRE 2016

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse 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 désire tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Dr Robert Moreau pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et permis d'entreprendre mon doctorat en biochimie. Merci Dr. Moreau pour votre soutien, votre confiance et votre patience tout au long de ces années de doctorat. Merci, d'avoir investi temps et énergie dans ma formation et de m'avoir constamment soutenue et encouragée. Merci pour vos précieux conseils et vos suggestions, de même que pour votre encadrement tout au long de la rédaction de cette thèse.

Je tiens à remercier ma co-directrice de recherche Dre Louise Brissette qui a grandement contribué à la réalisation de ce projet de doctorat. Merci pour vos nombreux conseils scientifiques et pour votre soutien dans les moments plus difficiles.

De nombreuses personnes sont passées dans le laboratoire tout au long de ces années. Je remercie tout particulièrement Dre Corine Martineau pour sa contribution significative à mon projet, pour ses conseils et tous nos échanges scientifiques. Merci également à James Sanchez-Dardon pour son expertise et son aide dans la réalisation de certaines expériences. Je désire aussi remercier Marine Régnier, Céline Signor, Rachel Pierre, Abdallah Fallah, Véronique Arseneault, Pierre-Paul Galant. Votre présence a ainsi rendu mon travail plus facile et plus agréable.

J'en profite également pour remercier Louise Martin-Falstrault et Jade Desjardins pour leur aide dans le maintien de la colonie de souris. Enfin, je remercie Denis Flipo pour son expertise en microscopie confocale et en cytométrie en flux. Un merci spécial va aux membres de ma famille qui m'ont toujours soutenue et encouragée. J'exprime toute ma gratitude à mon mari Dmytro, à mes enfants Alexander et Paul et à mes parents, Slava et Aline qui m'ont appuyée toutes ces années. La réalisation de ce travail n'aurait pas été possible sans eux.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES ix		
LISTE DES TABLEAUXxi		
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES		
RÉSUMÉxvii		
CHAPITRE I ÉTAT DES CONNAISSANCES		
1.1 Introduction		
1.2 Tissu osseux		
1.2.1 Anatomie de tissu osseux		
1.2.2 Ossification		
1.2.3 Plaque de croissance		
1.2.4 Composants du tissu osseux		
1.2.5 Fonction du tissu osseux		
1.3 Modelage et remodelage osseux		
1.3.1 Phase d'activation		
1.3.2 Phase de résorption		
1.3.3 Phase d'inversion14		
1.3.4 Phase de formation		
1.3.5 Phase quiescente		
1.4 Cellules osseuses		
1.4.1 Ostéoclaste		
1.4.2 Ostéoblaste		
1.4.3 Ostéocyte		
1.5 Régulation du remodelage osseux		
1.5.1 Système RANKL/RANK/OPG 19		
1.5.2 Leptine		
1.6 Cellules stromales mésenchymateuses		

1.6.1 Différenciation de cellules stromales mésenchymateuses	
1.6.2 Origine des chondrocytes	
1.6.3 Origine des adipocytes	
1.6.4 Origine des ostéoblastes	
1.7 Voie de signalisation Wnt	
1.7.1 Acteurs de la voie Wnt	
1.7.2 Régulation de la voie Wnt	
1.7.3 Voie Wnt et ostéogénèse	
1.8 Ostéoporose	
1.8.1 Étiologie	
1.8.2 Diagnostique	
1.8.3 Traitements	
1.9 Lipoprotéines	
1.9.1 Métabolisme des LDL	
1.9.2 Oxydation de lipoprotéines	
1.10 Récepteurs scavenger	
1.11 Cluster of differentiation (CD36)	40
1.11.1 Identification	
1.11.2 Gène CD36, ses transcrits alternatifs et mutations	41
1.11.3 Structure de CD36	44
1.11.4 Sites de liaison de CD36	
1.11.5 Distribution tissulaire de CD36	46
1.11.6 Ligands et fonctions biologiques de CD36	47
1.11.7 Voies de signalisation activées par les ligands de CD36	
1.11.8 Régulation de l'expression de CD36	53
1.11.9 Déficience en CD36	
1.12 Problématique, hypothèses et objectifs	57
1 12 Approche expérimentale	50

CHAPITRE II

LOW-BONE-MASS PHENOTYPE OF DEFICIENT MICE FOR THE
CLUSTER OF DIFFERENTIATION 36 (CD36)
2.1 Avant-propos
2.2 Résumé
2.3 Abstract
2.4 Introduction
2.5 Material and methods
2.5.1 Animals
2.5.2 Plasma analysis
2.5.3 Documentation of bone architecture
2.5.4 Bone histochemistry
2.5.5 Primary cultures of osteoblasts
2.5.6 Alcaline phosphatase activity
2.5.7 MTT activity
2.5.8 PCR amplification72
2.5.9 Statistical analysis74
2.6 Results
2.6.1 Body weight, bone length and plasmatic markers
2.6.2 Determination of bone architecture
2.6.3 Plasma levels of bone remodeling markers and bone histochemistry 76
2.6.4 Functions of osteoblasts from Cd36KO mice
2.7 Discussion
2.8 Tables and figures

CHAPITRE III SYSTEMIC AND CELLI

SYSTEMIC AND CELLULAR ALTERATIONS IN CD36-DEFICIENT	
MICE REDUCE SURVIVAL AND OSTEOGENIC POTENTIAL	
OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS	94
3.1 Avant-propos	95

3.2 Résumé	. 96
3.3 Abstract	. 97
3.4 Introduction	. 98
3.5 Materials and methods 1	100
3.5.1 Animals1	100
3.5.2 Plasma analysis1	101
3.5.3 Primary cultures and cell lines 1	101
3.5.4 Apoptosis and cell cycle assay 1	102
3.5.5 Proliferation assays 1	102
3.5.6 PCR	103
3.5.7 Statistical analysis 1	104
3.6 Results	104
3.6.1 Leptinemia and endochondral ossification 1	104
3.6.2 Cell proliferation and survival 1	105
3.6.3 Effects of CD36 ligands 1	106
3.6.4 Wnt signaling pathway1	07
3.7 Discussion	107
3.8 Acknowledgments 1	14
3.9 Tables and Figures	15
CHAPITRE IV DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES	24
4.1 Discussion	24
4.1.1 La déficience en Cd36 est associée au phénotype ostéoporotique 1	25
4.1.2 La production de marqueurs de la formation osseuse est diminuée chez les souris Cd36KO	26
4.1.3 L'influence des lipides de l'adiposité et de la leptine sur le phénotype osseux des souris Cd36KO 1	27
4.1.4 La diminution de la prolifération des CSM contribue à la perte de la masse osseuse chez les souris Cd36KO	31

4.1.5 Apoptose accrue des CSM derivées de souris Cd36KO 132
4.1.6 L'engagement des CSM dans la voie ostéogénique
4.1.7 Modulation de l'expression de facteurs de transcription et de marqueurs des ostéoblastes chez les souris <i>Cd36</i> KO
4.1.8 La voie Wnt est impliquée dans la formation du phénothype ostéopénique chez les souris <i>Cd36</i> KO
4.1.9 L'engagement des CSM dans la voie chondrogenique
4.2 Conclusion
4.3 Perspectives
RÉFÉRENCES

LISTE DES FIGURES

Figur	ePage
1.1	Anatomie d'un os long
1.2	Organisation du tissu osseux
1.3	Développement osseux endochondral
1.4	Structure de la plaque de croissance
1.5	Le cycle du remodelage osseux
1.6	Minéralisation au sein des fibrilles de collagène de type I
1.7	Ostéoblaste
1.8	Système RANK-RANKL-OPG
1.9	Capacités de différenciation des CSM
1.10	La régulation de différenciation des CSM
1.11	Voie de signalisation Wnt
1.12	Représentation schématique d'os sain et d'os ostéoporotique
1.13	Les classes des SR
1.14	Représentation schématique du gène CD36
1.15	Structure de CD36 et principaux sites de liaison
2.1	Body weight and bone length of 1 to 6 month-old WT and Cd36KO mice 85
2.2	Microarchitecture analysis of trabecular femoral bone of WT and Cd36KO mice
2.3	Microarchitecture analysis of cortical femoral bone of WT and Cd36KO mice
2.4	Microarchitecture analysis of vertebrae of WT and Cd36KO mice
2.5	Plasma markers of bone remodeling and bone histochemical analysis of long bones from WT and Cd36KO mice
2.6	Phenotypic profile of bone marrow-derived MSC from WT and Cd36KO mice
2.7	Cell culture expansion and alkaline phosphatase activity of <i>Cd36</i> -deficient bone cells
2.8	Cell survival of Cd36-deficient osteoblasts
2.9	Expression of osteoblastic genes by cells from WT and Cd36KO mice

3.1	Impaired leptin production in Cd36-null mice	117
3.2	Chondrogenic status of Cd36-null mice	118
3.3	Proliferation and apoptosis of Cd36-null bone marrow MSCs	119
3.4	Effect of hexarelin and TSP-1 treatment on MC3T3-E1 cells and WT and Cd36-null bone marrow MSCs	120
3.5	Disbalance of PPARy and its co-regulators expression in Cd36-null mice	121
3.6	Member of Wnt signaling pathway in WT and <i>Cd36</i> -null bone marrow MSCs	122
3.7	Wnt signalling response in WT and <i>Cd36</i> -null bone marrow MSCs after 24h stimulation with Wnt3a	123

LISTE DES TABLEAUX

Tabl	eau	Page
2.1	Plasma levels of total cholesterol, HDL cholesterol and LDL cholesterol of WT and Cd36KO mice	84
2.2	Plasma levels of glucose, calcium, phosphate and ALP activity of WT and Cd36KO mice	84
2.3	Sequence of primers for genes expression	116
2.4	Cell cycle analysis by cytometry	117

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

αΜΕΜ	Minimal essential medium, alpha modification
β2-AR	béta 2-adrénergique
ABC	transporteur cassette liant l'ATP
ABCA1	transporteur cassette liant l'ATP A1
ADN	acide désoxyribonucléique
AGLC	acides gras à longue chaîne
AGE	produit terminal de glycation
AGL	acide gras libre
ALP	phosphatase alcaline
AMPc	adénosine 3',5'-monophosphate cyclique
AMPK	kinase activée par l'adénosine 3',5'-monophosphate
APC	adenomatose polypose coli
Аро	apolipoprotéine
ATP	adénosine triphosphate
ARNm	acide ribonucléique messager
BFR	bone formation rate
BMP	bone morphogenetic protein
BS	bone surface
BSP	sialoprotéine osseuse; bone sialoprotein
BV	bone volume
Cbfal	core-binding factor alpha 1
CCN	cycline
CD	cluster of differentiation
CD36	récepteur cluster of differentiation 36
СД36КО	souris déficientes en CD36
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein

CoA	coenzyme A
COL	collagène
CSM	cellule stromale mésenchymateuse
СТ	computed tomography
CTX	télopeptide C-terminal du collagène de type I; C-terminal telopeptide
	of type I collagen
DKK	dickkopf
DVL	disheveled
EC	esters de cholestérol
EGF	facteur de croissance épidermique; epidermal growth factor
ELISA	essai immunosorbant couplé à une enzyme
ERK	kinase régulée par signal extracellulaire
FABP	protéine de liaison d'acides gras; fatty acid binding protein
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FAK	kinase d'adhésion focale
FAS	synthétase des acides gras
FAT	translocase des acides gras
FATP	transporteur des acides gras
FBS	fetal bovine serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
FGF	facteur de croissance des fibroblastes; fibroblast growth factor
Fzd	récepteurs de la classe Frizzled
GAPDH	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GH	hormone de croissance
GHRP	peptide sécréteur de l'hormone de croissance; growth hormone
	releasing peptide
GP	glycoprotéine
GSK	glycogene synthase kinase
HDL	lipoprotéine de haute densité; high density lipoprotein

HIF-1	facteur 1 induit par l'hypoxie
HH	hedgehog
HODE	acide hydroxyoctadécadiénoïque
IDL	lipoprotéine de densité intermédiaire
IGF1	insulin-like growth factor1
IHH	Indian hedgehog
IL	interleukine
IFN	interféron
JNK	kinase du N-terminal de c-Jun; c-Jun N-terminal kinase
ко	délété; knock out
LDL	lipoprotéine de faible densité; low density lipoproteins
LDLox	lipoprotéines de faible densité oxydées
Lep	leptine
LPL	lipoprotéine lipase
LPS	lipopolysaccharide
LRP	LDL receptor related protein
LXR	récepteur X du foie
MAPC	multipotent adult progenitor cells
МАРК	protéine kinase activée par les mitogènes; mitogen-activated protein
	kinase
MAR	mineral apposition rate
M-CSF	facteur stimulant les colonies de granulocytes; macrophage-colony
	stimulating factor
μCT	micro tomographie
MS	mineralizing surface
MSC	mesenchymal stromal cells
MTT	3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltetrasodium bromide
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide H
NF-ĸB	facteur nucléaire kappa B

NFATC1	nuclear factor of activated T-cells
NO	oxyde nitrique
NOS	synthétase de l'oxyde nitrique
Ob	ostéoblaste
Ob-R	récepteur de la leptine
Oc	ostéoclaste
OCN	ostéocalcine
OPG	ostéoprotégérine
OSX	ostérix
Ox	oxidé; oxidized
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	facteur de croissance dérivé des plaquettes; platelet derived growth
	factor
PE	phycoerythrin
PfEMP1	Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1
PICP	propeptide d'extension C-terminale
PINP	propeptide d'extension N-terminale ; propeptide of type I procollagen
PKC	protein kinase C
Pl	Plasmodium
Pm	perimeter
PMMA	polyméthylméthacrylate
p-NP	para-nitrophenolate
PPAR	récepteur activé par les proliférateurs des peroxisomes
PTH	hormone parathyroïde; parathyroid hormone
RANK	récepteur activateur du facteur nucléaire kappa-B; receptor activator
	of nuclear factor κB
RANK-L	receptor activator of nuclear faktor KB ligand
rLDL	récepteurs de lipoprotéines de faible densité

ROS	espèce réactive de l'oxygène
RSPO	R-spondine
RT	reverse transcription
RUNX2	runt-related transcription factor 2
RXR	récepteur X des rétinoïdes
sFRP	secreted Frizzled related proteins
SHH	Sonic hedgehog
SOX9	SRY (sex determining region Y)-box 9
SR	récepteur scavenger; scavenger receptor
TG	triglycéride
TGF-β	facteur de croissance transformant β ; transforming growth factors β
TLR	toll-like receptor
TNF	facteur de nécrose tumorale; tumor necrosis factor
TRAP	phosphatase acide résistante au L-tartrate; tartrate resistant acide
	phosphatase
TSP-1	thrombospondine-1
TV	tissue volume
VEGF	vascular endothelial growth factor
VLDL	lipoprotéine de très basse densité
WHO	world health organisation
WIF	Wnt inhibitory protein
Wnt	wingless type
WT	type sauvage; wild-type

RÉSUMÉ

Le tissu osseux se renouvelle en permanence et ce processus est caractérisé par l'équilibre entre la résorption d'os ancien par les ostéoclastes et la formation d'os nouveau par les ostéoblastes. Les fonctions ostéoblastiques constituent le point central de l'équilibre du remodelage osseux. Récemment, nous avons démontré que les ostéoblastes expriment les récepteurs scavenger de classe B de type I et II (SR-BI et SR-BII) ainsi que le cluster of differenciation 36 (CD36). Comme c'est un récepteur pour de multiples ligands, le CD36 assure différentes fonctions biologiques. Il est impliqué dans l'athérosclérose car on le considère comme un récepteur des lipoprotéines de faible densité oxydées (LDLox), dans l'angiogenèse via sa liaison avec la thrombospondine-1 (TSP-1), dans l'inflammation comme co-récepteur des récepteurs Toll-like (TLR), dans la phagocytose des érythrocytes infectés au Plasmodium (Pl.) falciparum et des cellules apoptotiques par la reconnaissance de la phosphatidylsérine et dans la captation cellulaire des acides gras. Il a été aussi suggéré que les ostéoblastes captent le cholestérol contenu dans les LDL et les HDL via ces récepteurs. Cependant, la fonction spécifique de CD36 dans la formation osseuse demeure inconnue. Ainsi, les objectifs de ce projet ont été de comparer la structure du tissu osseux, les fonctions des ostéoblastes in vitro, le potentiel de différenciation de cellules souches mésenchymateuse (CSM) et les voies de signalisation associées à l'ostéogenèse des souris deficientes pour le géne Cd36 (Cd36KO) à celle des souris de type sauvage (WT).

Les résultats du premier volet de la recherche montrent que l'ablation génique de Cd36 altère la formation osseuse et mène au développement d'un phénotype ostéopénique. Une étude histologique a démontré une diminution du périmètre osseux couvert par les ostéoblastes et une réduction du taux de formation osseuse chez les souris Cd36KO des deux genres âgées de l à 6 mois. La micro tomographie avec une reconstruction 3D a révélé une diminution du volume osseux associée à une augmentation de la séparation trabéculaire et une réduction du nombre de trabécules dans la métaphyse du fémur et le corps des vertèbres lombaires de souris Cd36KO par rapport aux souris WT. La maturation et le fonctionnement des ostéoblastes sont associés à l'expression de facteurs de transcription et de gènes spécifiques. Les CSM dérivées de souris Cd36KO expriment moins de Runt-related transcription factor 2 (Runx2), d'ostérix (Osx), de sialoprotéine osseuse (Bsp) et d'ostéocalcine (Ocn). Globalement, ces résultats suggèrent l'implication de Cd36 dans le métabolisme osseux et plus particulièrement dans la biologie des ostéoblastes.

Dans le deuxième volet, nous avons déterminé si la délétion de *Cd36* affecte le fonctionnement des CSM *in vitro*. La caractérisation des CSM de souris *Cd36*KO a montré une réduction de la prolifération des cellules et de leur survie avec une augmentation du taux d'apoptose. L'étude des gènes qui régulent le cycle cellulaire a

révélé une augmentation de l'expression des cyclines (Ccn) A2 et D1 dans les cellules issues des souris Cd36KO. Pour révéler le rôle de Cd36 dans la prolifération des CSM nous avons comparé le taux de prolifération des cellules incubées avec les ligands de Cd36, l'hexaréline et la TSP-1. Une stimulation de la prolifération des cellules de lignée ostéoblastique murine MC3T3-E1 et de cultures primaires de cellules compétentes pour le Cd36 et l'absence d'effet dans les cellules Cd36KO suggèrent l'implication de Cd36 dans la croissance des précurseurs ostéoblastiques. En plus, le taux sanguin de leptine, une hormone impliquée dans le maintien de la masse osseuse est diminué chez les souris Cd36KO, ce qui pourrait être un des mécanismes de développement de l'ostéopénie chez ces souris. La différenciation ostéoblastique des CSM implique, entre autres, les voies de la signalisation Wingless type (Wnt). Les études démontrent une diminution de l'expression de Wnt3a et Wnt5a dans les CSM dérivées de souris Cd36KO, l'absence de modification de l'expression d'agonistes de la voie Wnt, de R-spondine 2 (Rspo) et des LDL receptor related protein 5/6 (Lrp) ainsi qu'une augmentation de l'expression d'antagonistes de la voie Wnt, dont le dickkopf-1 (Dkk1) et la sclérostine (Sost). Ces données suggèrent que la faible masse osseuse des souris Cd36KO pourrait être due à l'altération de la signalisation Wnt. Les mécanismes qui modulent la voie Wnt en absence de Cd36 restent encore à élucider.

En conclusion, l'ensemble des résultats supporte l'hypothèse d'un rôle de CD36 dans le métabolisme osseux, dans le maintien d'une formation osseuse adéquate et dans les fonctions des ostéoblastes. Les mécanismes exacts de ce rôle demandent des investigations supplémentaires.

Mots clés : CD36, cellule souche mésenchymateuse, ostéoblastes, métabolisme osseux, ostéoporose, Wnt.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Introduction

L'os est un tissu dynamique qui se trouve en renouvellement permanent sous l'action de la résorption du tissu osseux par les ostéoclastes et la formation d'un nouveau tissu osseux par les ostéoblastes. L'équilibre entre ces deux processus assure le maintien de la masse osseuse et le renouvellement perpétuel de la matrice osseuse (Marie, 2001). Dans bien des cas où l'équilibre est perdu, il y a apparition d'ostéoporose, caractérisée par une faible densité osseuse et des altérations de la microarchitecture osseuse (WHO, 2003), et qui s'accompagne de risques accrus de fractures. L'ostéoporose affecte environ 2 millions de Canadiens ; 25% des femmes et 13% des hommes de plus de 50 ans souffrent de cette maladie et sa prévalence s'accroît avec le vieillissement de la population (http://www.osteoporosecanada.ca/losteoporose-etvous/donnees-et-statistiques-sur-losteoporose/). Les cellules responsables de la formation osseuse sont les ostéoblastes. Leur fonction principale est de synthétiser et de minéraliser la matrice osseuse au cours de la croissance du squelette, du renouvellement de la matrice osseuse chez l'adulte et de la réparation osseuse tout au long de la vie. Récemment, nous avons démontré que les ostéoblastes expriment différents récepteurs scavenger de classe B (SR-B) tels que le SR-BI, le SR-BII et le cluster of differentiation (CD) 36 (Brodeur et al., 2008). CD36 est une protéine transmembranaire exprimée dans un grand nombre de cellules et de tissus, comme les monocytes/macrophages, les plaquettes, les adipocytes, les cellules musculaires lisses, l'épithélium de la rétine et le foie (Febbraio et al., 2001; Okumura et Jamieson, 1976; Ryeom et al., 1996). CD36 est impliqué dans l'angiogenèse, le transport des acides gras, l'inflammation, la phagocytose des cellules apoptotiques et des érythrocytes infectés par Plasmodium (Pl.) falciparumt, ainsi que dans la captation

cellulaire des acides gras (Silverstein et Febbraio, 2009). Il serait de plus associé positivement avec l'athérosclérose car on le considère comme un récepteur des lipoprotéines de faible densité oxydées (LDLox) (Boullier, 2001). Malgré que la présence de CD36 dans les cellules osseuses soit établie, son implication dans le métabolisme de tissu osseux n'est pas encore élucidée. Afin de caractériser le rôle de CD36 dans le métabolisme du tissu osseux, ce projet de recherche vise à documenter l'effet de l'ablation de Cd36 sur la structure du tissu osseux et la physiologie des ostéoblastes.

La première partie de cette thèse porte sur l'état des connaissances actuelles sur le métabolisme du tissu osseux, incluant son origine, son développement, son remodelage et sa régulation, et en deuxième temps sur le récepteur CD36, sa structure, son rôle physiologique et sa régulation. Cette partie inclut également l'hypothèse et les objectifs de travail. La deuxième partie regroupe les résultats expérimentaux de l'auteure, rapportés sous la forme de deux articles. La troisième partie fait le bilan de l'ensemble des travaux et suggère de possibles avenues pour continuer cette recherche.

1.2 Tissu osseux

1.2.1 Anatomie du tissu osseux

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé, caractérisé par la nature solide de sa matrice extracellulaire. Le tissu osseux forme le squelette qui soutient le corps et protège les organes internes. On distingue macroscopiquement une partie périphérique représentée par l'os cortical ou compact et une partie centrale formée de l'os trabéculaire ou spongieux (Fig.1.1). Leur différence est basée sur le degré de porosité qui est de 5 à 30% (principalement de 5% à 14%) pour l'os cortical (Macdonald *et al.*, 2011; McCalden *et al.*, 1993) et de 30 à 90% (principalement de

75% à 95%) pour l'os trabéculaire (Doblare *et al.*, 2004). L'os trabéculaire est riche en cellules conjonctives, en cellules adipeuses et en éléments sanguins, et l'os cortical est une partie osseuse dense, dure et très résistante. L'ensemble est entouré d'une enveloppe externe, le périoste, sauf au niveau du cartilage articulaire et aux endroits d'insertion des tendons et des ligaments.



Figure 1.1 : Anatomie d'un os long

A) Structure générale d'un os long. B) Grossissement de l'épiphyse et structure trabéculaire de l'os. C) Grossissement de la diaphyse et organisation du cortex osseux.

Tiré de http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio210/chap06/lecture1.html

Le tissu osseux spongieux est formé par un lacis tridimensionnel de trabécules de tissu osseux, ramifiés et anastomosés, délimitant un labyrinthe d'espaces inter-reliés occupés par de la moelle osseuse et des vaisseaux. L'unité structurale du tissu osseux cortical est l'ostéon (Fig. 1.2) constitué d'un ensemble de cylindres creux de matrice osseuse (les lamelles). Ces lamelles osseuses adjacentes s'orientent selon des

dispositions différentes, renforçant la solidité globale de l'os aux contraintes mécaniques. Anatomiquement, l'ostéon est traversé en son centre par un canal où passent de petits vaisseaux sanguins et des fibres nerveuses: le canal de Havers. Les canaux de Havers sont reliés entre eux, et avec la cavité médullaire et avec la surface de l'os par des canaux transversaux ou obliques, les canaux de Volkmann. Les os sont entourés d'une membrane, le périoste, qui est richement vascularisée (Clarke, 2008).



Figure 1.2 : Organisation du tissu osseux

A) Composition de la diaphyse. B) Grossissement d'un ostéon. C) Coupe transversale d'un ostéon. Tiré de http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio210/chap06/lecture1.html

Il existe trois types d'os: les os plats, tels que les omoplates, les côtes et les os crâniens, les os courts tels que les os de la main, du pied et les vertèbres et les os longs tels que les os des membres : fémur, tibia, etc. L'os long se décomposent en diaphyse, la partie moyenne située entre les épiphyses, les extrémités supérieure et inférieure de l'os recouvertes de cartilage et permettent l'articulation des os entre eux.

On peut également distinguer la métaphyse qui est une zone de transition entre l'épiphyse et la diaphyse (Fig. 1.1).

1.2.2 Ossification

Le développement osseux chez l'humain et les mammifères est un processus complexe composé de phases séquentielles de morphogenèse et de croissance. Trois types d'ossification désignés intramembranaire, endochondrale et périostique, contribuent au développement du squelette adulte (Marie, 2001).

L'ossification intramembranaire, concernant les os plats se base sur la différenciation directe de cellules ostéoprogénitrices mésenchymateuses en ostéoblastes sans l'intermédiaire d'un modèle cartilagineux. Elle débute par la condensation des cellules mésenchymateuses qui se différencient en fibroblastes qui élaborent des fibres de collagène (COL) déposées entre les cellules. Des cellules ostéoprogénitrices s'appliquent contre ces travées conjonctives, se transforment en ostéoblastes actifs et produisent la matrice osseuse (Olsen *et al.*, 2000).

L'ossification endochondrale, responsable de la formation et de la croissance en longueur des os longs, des vertèbres et des os de la base du crâne, est caractérisée par le dépôt de matrice osseuse sur une matrice cartilagineuse préexistante (Fig. 1.3) (Mackie *et al.*, 2008). Cette matrice est issue de la condensation de cellules mésenchymateuses, qui lors du développement fœtal du squelette se différencient en chondrocytes et sécrètent une matrice extracellulaire. Les chondrocytes du centre de la pièce cartilagineuse augmentent leur volume en se transformant en chondrocytes hypertrophiques. Par la suite, les chondrocytes hypertrophiques meurent par apoptose laissant des cavités vides et permettant la néovascularisation et l'arrivée des ostéoblastes. Les ostéoblastes ensuite élaborent au centre du cartilage une substance pré-osseuse et forment par la suite un tissu osseux spongieux primaire qui est remodelé en os trabéculaire. Ce processus d'ossification dure toute la vie intra-utérine

et continue durant les vingt premières années de la vie dans la métaphyse. L'ossification endochondrale assure donc le remplacement d'une structure cartilagineuse en os et la croissance en longueur des os longs (Mackie *et al.*, 2011).



Figure 1.3 : Développement osseux endochondral

1) Les chondrocytes se différencient au sein des condensations mésenchymateuses afin de former la base cartilagineuse des futurs os, 2) apparition du col osseux dans la partie centrale, hypertrophie chondrocytaire suivie par une invasion de cellules vasculaires et ostéoblastiques au niveau du col osseux, 3) formation des centres d'ossification primaire, 4) extension du processus vers l'extrémité des os et la formation des centres d'ossification secondaire, 5) formation des plaques de croissance matures dans les épiphyses et remplacement du cartilage par l'os, 6) ossification de la plaque de croissance (Mescher, 2009).

L'ossification périostique se produit autour des os à partir du périchondre. Lors de l'ossification périostique l'ébauche osseuse initiale du cartilage est comme au début de l'ossification endochondrale. Les chondrocytes hypertrophiques favorisent la différenciation des cellules adjacentes au périchondre en ostéoblastes qui sécrétent une matrice osseuse de la partie corticale. L'ossification périostique permet la croissance en épaisseur de l'os et assure une augmentation du diamètre de la diaphyse osseuse.

1.2.3 Plaque de croissance

Dans l'os en croissance, l'épiphyse est séparée de la métaphyse par une couche intermédiaire de cartilage hyalin contenant les chondrocytes qui se différencient de façon bien régulée et subissent les changements morphologiques spécifiques (Hunziker *et al.*, 1987). Ces chondrocytes forment des colonnes avec une orientation bien précise permettant l'allongement de l'os. Cette zone est appelée plaque de croissance et elle s'organise en différentes couches cellulaires successives (Fig.1.4) (Ballock et O'Keefe, 2003).



Zone de réserve Zone proliférative

Zone hypertrophique

Zone d'invasion vasculaire

Figure 1.4 : Structure de la plaque de croissance

A) L'épiphyse d'un os en croissance. B) Grossissement de la plaque de croissance avec les différentes zones caractéristiques. Tiré de http://www.gla.ac.uk/s4/~fbls/files/fab/tutorial/generic/bone5.html

Au sommet de la plaque de croissance, juste sous l'épiphyse, la première couche formée de chondrocytes arrondis possédant un potentiel de prolifération très faible constitue la zone de réserve (Ballock et O'Keefe, 2003; Hunziker et al., 1987; Mackie et al., 2011). Dans la zone proliférative les chondrocytes sont plus nombreux, aplatis et munis d'une forte capacité de prolifération. Dans ces deux zones les chondrocytes sécrètent du COL-II. Ils s'organisent en groupes isolés de leurs voisins par une travée de matrice organique et construisent un chondrone ordonné en forme de colonne longitudinale (Abad et al., 2002). Ceci contribue à la croissance en longueur de l'os. Dans la zone hypertrophique, les chondrocytes augmentent de volume suite à un apport en fluide. Ils sécrètent du COL-X et de la phosphatase alcaline (ALP) qui calcifie la matrice cartilagineuse entourant les colonnes de chondrocytes. Les chondrocytes meurent par apoptose et la matrice, qu'ils entretenaient, commence à se désintégrer et être progressivement remplacée par le tissu osseux (Kronenberg, 2003). La zone d'invasion vasculaire est l'endroit de pénétration des bourgeons, formés des vaisseaux sanguins et des cellules ostéoprogénitrices, dans la zone d'érosion du cartilage. Dans cette zone, les septa transversaux situés entre les chondrocytes hypertrophiés sont détruits. À la fin de la période de croissance, la plaque de croissance devient moins épaisse et est remplacée par le tissu osseux ce qui provoque la fusion de l'épiphyse et de la métaphyse (Gerber, 1999). À la suite de cette fusion, aucune croissance en longueur de l'os ne survient.

1.2.4 Composants du tissu osseux

Le tissu osseux se compose de cellules (ostéoblastes, ostéocytes, ostéoclastes) et d'une matrice extracellulaire (Couret, 2004). La matrice extracellulaire représente entre 92 et 95% du volume tissulaire et peut être subdivisée en matrice organique et inorganique (Cohen, 2006). Les molécules inorganiques représentent les deux tiers de la masse osseuse. La teneur en eau, environ de 9%, est très variable en fonction de

l'âge et du degré de minéralisation. La matrice organique représente 22% de la masse osseuse et forme l'ostéoïde. Elle est composée à 90% de substance fibrillaire contenant des protéines structurales telles que le COL-I et l'élastine ou des protéines adhérentes (fibronectine et vitronectine) (Gelse *et al.*, 2003) et de la substance interfibrillaire (10%) incluant les glycosaminoglycanes, les protéoglycanes, de petites protéines non collagéniques (ostéopontine, ostéonectine, ostéocalcine (OCN), de la thrombospondine (TSP) et de la sialoprotéine osseuse (BSP)) ainsi que de petites quantités de lipides (Boskey, 2013; Young, 2003). L'OCN est spécifique au tissu osseux et y existe en quantité abondante, représentant 15 à 25 % des protéines non collagéniques de l'os. L'OCN semble avoir un rôle chimiotactique pour les ostéoclastes et favoriser leur adhésion et leur étalement (Gehron Robey, 1989). La matrice inorganique est représentée par les sels minéraux parmi lesquels les plus abondants sont le calcium et le phosphore. Le phosphate de calcium forme les cristaux d'hydroxyapatite (Boskey, 2013; Shekaran et Garcia, 2011).

Parmi les protéines qui composent tous les tissus, le collagène est le plus abondant. On retrouve cette protéine hétérotrimérique dans plus de 28% du tissu osseux sous forme de COL-I composée de deux chaînes α -1 et une chaîne α -2 (Gelse *et al.*, 2003). La famille du collagène compte au moins une quarantaine de gènes, produisant ainsi au moins 27 différents types de collagène (Ruggiero *et al.*, 2005). Il existe plusieurs types cellulaires qui participent activement à la production du collagène. Les ostéoblastes, les fibroblastes, les chondrocytes et les cémentoblastes sont les principaux producteurs des différents types de collagène. Les ostéoblastes produisent le COL-I qui est le constituant majeur de l'os, produit sous la forme de pro-COL- α I (Brodsky et Persikov, 2005). Le COL-I constitue 95% de tous les collagènes osseux et donne la force de tension au tissu conjonctif (Viguet-Carrin *et al.*, 2006). Les autres types de COL, tels que les types III et V, sont présents à de faibles niveaux dans l'os et semblent moduler le diamètre des fibrilles ou assurer l'attachement des ligaments à l'os (Keene *et al.*, 1991; Niyibizi et Eyre, 1994). L'ALP spécifique à l'os est une enzyme produite par les ostéoblastes essentielle pour la minéralisation osseuse (Orimo, 2010). L'ALP circulante provient de plusieurs tissus incluant les intestins, les reins, le placenta, le foie, l'os ainsi que plusieurs types de tumeurs. Le rôle précis de l'ALP dans la minéralisation osseuse n'est pas complètement élucidé. Toutefois, il est suggéré que cette enzyme augmente la concentration locale du phosphate inorganique, détruit les inhibiteurs de la formation de cristaux d'hydroxyapatite ou encore lie le calcium et/ou la calcium-adénosine triphosphatase (Addison *et al.*, 2007).

L'OCN osseuse est une protéine non collagénique de petite taille, spécifique du tissu osseux et de la dentine. L'OCN constitue 25% des protéines non collagéniques de la matrice extracellulaire osseuse et est exclusivement synthétisée par les ostéoblastes matures sous l'action de la 1,25-dihydroxyvitamine D3 (Owen *et al.*, 1991), des œstrogènes (Qu *et al.*, 1998), de l'hormone parathyroïde (PTH) (Yu et Chandrasekhar, 1997), des glucocorticoïdes (Shalhoub *et al.*, 1998), des facteurs de croissance (Hughes-Fulford et Li, 2011) et de l'adénosine 3', 5'-monophosphate cyclique (AMP-c) (Boudreaux et Towler, 1996). La fonction physiologique de l'OCN dans le métabolisme osseux n'est pas encore totalement élucidée. Un double rôle de l'OCN dans l'os est suggéré, tout d'abord dans la régulation de la maturation des ostéoblastes et la minéralisation osseuse (Boskey *et al.*, 1985; Hunter *et al.*, 1996), et ensuite dans la modulation de la formation et de l'activité des ostéoclastes (Ishida et Amano, 2004; Lian *et al.*, 1984). La concentration sérique de l'OCN est corrélée à la vitesse de croissance osseuse et le dosage de l'OCN est utile au suivi de l'efficacité thérapeutique du traitement de l'ostéoporose (Biver *et al.*, 2012).

1.2.5 Fonctions du tissu osseux

Le tissu osseux assure des fonctions essentielles aux niveaux mécanique, métabolique et hématopoïétique. Le squelette sert à protéger les organes viscéraux, agit comme support mécanique pour des tissus mous et offre plusieures sites d'attachement aux muscles impliqués dans la locomotion. La croissance de l'os assure la croissance de l'organisme. Le tissu osseux est impliqué dans le maintien de l'homéostasie du calcium et du phosphate sérique qui est régulé par le système endocrinien et plus PTH. 1.25particulièrement par trois hormones calcitropes : la le dihydrocholécalciférol et la calcitonine. La moelle osseuse est le site majeur de l'hématopoïèse chez l'adulte. Les cellules souches hématopoïétiques peuvent aussi se différencier en leucocytes et globules rouges et ainsi être impliquées dans la réponse immunitaire et les échanges gazeux.

1.3 Modelage et remodelage osseux

Pour maintenir ses fonctions, l'os doit subir un remodelage permanent. Pendant l'enfance, le modelage et le remodelage osseux coexistent, alors que chez l'adulte seul le remodelage persiste. Le modelage osseux assure la formation des os *in utero* et pendant l'enfance jusqu'à la maturité du squelette à l'adolescence. Suite à la période de modelage, l'os subit un remodelage permanent (Fig. 1.5). Ce processus permet de préserver les propriétés biomécaniques du tissu osseux et d'assurer l'homéostasie minérale. Le squelette adulte se renouvelle en permanence d'environ 10 % par an et 10 ans sont nécessaires pour un renouvellement complet de l'os adulte (Cohen, 2006). Ce remodelage est assuré par deux types cellulaires, les ostéoclastes qui résorbent la matrice osseuse et les ostéoblastes qui synthétisent une nouvelle matrice (Clarke, 2008).



CYCLE DE REMODELAGE OSSEUX

Figure 1.5 : Le cycle de remodelage osseux

Le cycle de remodelage osseux commence par la migration des ostéoblastes vers des sites d'activation, ensuite les ostéoclastes détruisent la matrice osseuse et creusent des lacunes de résorption. Par la suite, les ostéoclastes quittent la lacune et laissent la place aux ostéoblastes qui colonisent la surface, puis reconstituent et minéralisent la matrice ostéoïde. Finalement les ostéoblastes se transforment en ostéocytes et en cellules bordantes qui protègent la surface osseuse.

Tiré de http://www.pearltrees.com/tpeagta/redaction/id9918917/item101399822

L'équilibre entre la dégradation et la formation de l'os maintient la masse osseuse et est régulé par un réseau complexe d'interactions entre les cellules osseuses, les hormones circulantes et les facteurs de croissance locaux. La séquence du remodelage osseux se déroule selon une chronologie bien précise en un même site résultant de l'activité d'une unité multicellulaire de base. À chaque instant, environ 5% des surfaces intra corticales et 20% des surfaces trabéculaires sont le siège d'un

remodelage. La durée moyenne d'une séquence de remodelage est de 4 à 6 mois (Princ et Piral, 2009).

1.3.1 Phase d'activation

La surface osseuse est normalement recouverte de cellules bordantes qui empêchent l'accès des ostéoclastes à la matrice extracellulaire. Les cellules bordantes seraient capables de percevoir un signal d'initiation dont la nature exacte est inconnue mais qui pourrait être hormonale, cytokinique ou encore relever d'un stimulus mécanique (fracture, prise de poids) (Pacifici, 1998; Turner et Pavalko, 1998). La captation de ce signal conduit à la dégradation de la fine couche de matrice non minéralisée située sous les cellules bordantes, exposant ainsi cette matrice à l'action des ostéoclastes. Sous l'action de facteurs ostéorésorbants, les ostéoblastes se rétractent et donnent l'accès aux ostéoclastes qui peuvent adhérer à la matrice osseuse.

1.3.2. Phase de résorption

La phase de résorption débute par l'activation des précurseurs ostéoclastiques présents dans la moelle osseuse au site de remodelage et conduit à leur différenciation en ostéoclastes matures (Marie, 2001). Parallèlement, les cellules bordantes éliminent la fine couche de collagène sur laquelle elles reposaient, permettant ainsi l'attachement des ostéoclastes à la surface osseuse. Les ostéoclastes délimitent ainsi l'espace de la résorption en diminuant le pH sous l'action de pompes à protons adénosine triphosphate (ATP)-dependent et le domaine apical de la membrane plasmique de l'ostéoclaste se différencie en une bordure en brosse. L'acidité de la chambre de digestion est entretenue par une pompe à protons spécifique de l'ostéoclaste qui grâce à l'activité de l'anhydrase carbonique II sécrète des ions H⁺ (Baron, 2001). Cette acidification favorise la transformation de la phase inorganique en cristaux solubles (Silver *et al.*, 1988) et permet la mise à nu de la matrice organique. Au niveau de la bordure en brosse, les nombreux lysosomes déversent leur contenu enzymatique (hydrolases acides et notamment phosphatases acides, cathepsines, collagénases, métalloprotéinases) ce qui conduit à la digestion des composants organiques de la matrice osseuse et à la libération des produits de dégradation du collagène dans la circulation sanguine (Baron, 2001). La lacune de résorption ainsi créée est appelée lacune de Howship. La phase de résorption dure de 2 à 4 semaines (Clarke, 2008).

1.3.3 Phase d'inversion

Une fois qu'ils finissent de creuser la lacune, les ostéoclastes meurent par apoptose et laissent place aux macrophages qui lissent le fond de la lacune. Les signaux qui lient les phases de la résorption osseuse et la formation osseuse sont encore mal établis, mais l'intervention des facteurs tels que le *transforming growth factor* β (TGF- β), *insulin-like growth factors* 1 et 2 (IGF), les *bone morphogenic proteins* (BMP), le *platelet derived growth factor* (PDGF) et les *fibroblast growth factors* (FGF) a été suggérée (Bonewald et Mundy, 1990; Hock *et al.*, 1988; Locklin *et al.*, 1999). Après 1 à 2 semaines, cette phase se termine par le recrutement des cellules ostéoprogénitrices de la moelle osseuse (Delaisse, 2014).

1.3.4 Phase de formation

La phase de formation comporte deux phases au cours desquelles les ostéoblastes jouent un rôle majeur : 1) la production de la matrice extracellulaire et 2) la minéralisation de cette matrice. La production de la matrice extracellulaire est liée à la prolifération et à l'activation des ostéoblastes. Quand la résorption osseuse est terminée, les cellules ostéoprogénitrices présentes à la surface de la matrice érodée au

fond de la lacune se divisent et se différencient en ostéoblastes. Ces ostéoblastes synthétisent une nouvelle matrice non minéralisée (appelée aussi ostéoïde) qui comble la lacune constituée de COL-I, de protéoglycanes et d'OCN (Murshed *et al.*, 2005). La vitesse d'apposition de la matrice par les ostéoblastes est de 2 à 3 μ m/jour. Plusieurs hormones, notamment les œstrogènes, les androgènes et la vitamine D stimulent la production de matrice osseuse. De nombreux facteurs de croissance sécrétés par les ostéoblastes et stockés dans la matrice osseuse lors de la résorption, agissent dans le même sens, en particulier l'IGF, les FGF, le TGF- β , les BMP et le PDGF (Eriksen, 2010).

La minéralisation osseuse se fait, dans un deuxième temps, au niveau du front de minéralisation, à la jonction entre le tissu ostéoïde et le tissu minéralisé (Fig. 1.6).



Figure 1.6 : Minéralisation au sein des fibrilles de collagène de type I

Les particules minérales sont très minces (2-4 nm) et alignées avec les fibres de collagène avec une distance de décalage axial de 67 nm (Fratzl *et al.*, 2004).

Les ostéoblastes produisent des vésicules matricielles qui initient la minéralisation de la matrice organique en favorisant les concentrations locales élevées en calcium et en phosphates et l'apposition de cristaux d'hydroxyapatite (Whyte, 1994). L'OCN augmente également la concentration locale de calcium extracellulaire et le fixe sur le tissu ostéoïde. La 1,25-dihydroxyvitamine D3 joue un rôle important en favorisant l'absorption intestinale du calcium et sa fixation sur l'os (van de Peppel et van Leeuwen, 2014).

1.3.5 Phase quiescente

Une fois la phase de formation achevée, les cellules osseuses rentrent en phase de repos jusqu'au prochain cycle. Pendant cette phase, certains ostéoblastes subissent l'apoptose, une partie s'emmure et s'inclue dans la matrice pour devenir des ostéocytes, et une autre partie freine son activité et devient les cellules bordantes qui recouvrent la surface osseuse et demeurent quiescentes jusqu'à une prochaine activation focale des ostéoclastes (Marie, 2001).

1.4 Cellules osseuses

1.4.1 Ostéoclaste

L'ostéoclaste est une cellule géante (50 à 100 μ m) multinucléée qui est située à la surface du tissu osseux en voie de résorption. L'ostéoclaste est d'origine hématopoïétique et provient des précurseurs de la lignée myéloïde des monocytes/macrophages (Boyle *et al.*, 2003). La différenciation des pro-monocytes en ostéoclastes se fait sous l'influence de facteurs de transcription tels que PU.1, facteur nucléaire κ B (NF- κ B), c-FOS, c-JUN, CREB1, *nuclear factor of activated T-cells* (NFATC1) (Inoue et Imai, 2014) et de facteurs de croissance dont les principaux sont le *macrophage-colony stimulating factor* (M-CSF), le ligand du récepteur activateur du NF- κ B (RANKL) et son antagoniste l'ostéoprotégérine (OPG) (Teitelbaum et Ross, 2003). La maturation des ostéoclastes et l'acquisition de leur fonction spécifique se font après leur migration vers la surface osseuse et leur fusion asynchrone, entraînant la formation d'une cellule multinucléée.

Les mécanismes contrôlant l'ostéoclastogenèse sont encore mal connus. Toutefois, des études récentes ont montré que la différenciation et l'activité ostéoclastiques sont modulées, entre autres, par des facteurs libérés par les ostéoblastes. Les cellules stromales ostéoblastiques expriment le RANKL qui stimule l'ostéoclastogenèse en agissant sur le récepteur RANK situé à la surface des précurseurs ostéoclastiques mononucléés (Boyce et Xing, 2008). L'ostéoclaste immature est ainsi transformé en ostéoclaste mature. Les ostéoblastes synthétisent également le M-CSF sous l'action de la vitamine D qui est un stimulateur de la résorption. D'autres cytokines de type *tumor necrosis facteur* (TNF) produites par les monocytes ont un effet mitogénique sur les précurseurs ostéoclastiques et régulent la production de M-CSF et d'interleukine (IL)-11 par les ostéoblastes (Li *et al.*, 2004). A l'inverse, l'OPG, un facteur soluble également produit par les cellules ostéoblastiques agit comme un antagoniste de RANKL. Les OPG et RANKL ont donc des effets opposés sur l'ostéoclastogenèse.

1.4.2. Ostéoblaste

L'ostéoblaste est une cellule spécialisée mononucléée ayant un cytoplasme intensément basophile dû à une richesse en réticulum endoplasmique rugueux (Fig.1.7).



Figure 1.7 : Ostéoblaste (x7000)

Ostéoblaste est une cellule mononucléée dérivée de la cellule souche mésenchymateuse.

Tiré de http://www.endotext.org/parathyroid/parathyroid1/parathyroid1.html

Les ostéoblastes forment des jonctions serrées avec les ostéoblastes adjacents et possèdent des régions de la membrane plasmique spécialisée dans le trafic et la
sécrétion vésiculaire (Mackie, 2003). L'ostéoblaste assure la synthèse et la minéralisation de la matrice osseuse et régule la différenciation des ostéoclastes Les ostéoblastes proviennent de la différenciation de cellules souches du stromamédullaire (Chamberlain *et al.*, 2007). L'ostéogenèse est caractérisée par l'engagement et la prolifération de cellules ostéoprogénitrices qui après arrêt de la multiplication cellulaire se différencient en ostéoblastes fonctionnels. La différenciation progressive de l'ostéoblaste est caractérisée par l'expression de gènes ostéoblastiques précoces tels que ceux de l'ALP, du COL-I, de l'ostéopontine, ou tardifs tels que ceux de la BSP et de l'OCN (Caetano-Lopes *et al.*, 2007).

La fonction principale de l'ostéoblaste est de synthétiser et de minéraliser la matrice osseuse au cours de la croissance du squelette, du renouvellement de la matrice osseuse chez l'adulte et de la réparation osseuse tout au long de la vie. Tel que mentionné précédemment, la matrice osseuse est composée majoritairement de COL-I (Brodsky et Persikov, 2005). Les ostéoblastes synthétisent également un grand nombre de protéines matricielles : l'OCN et l'ostéopontine qui représentent 50% des protéines non collagéniques de l'os, des molécules d'adhésion qui interagissent avec les intégrines, des protéoglycanes et des facteurs de croissance (Clarke, 2008).

Les ostéoblastes sécrètent d'abord la matrice organique ou matrice ostéoïde, structurée par les fibres de collagènes où les protéines non collagéniques sont intriquées (Ottani *et al.*, 2002). Les ostéoblastes matures contrôlent ensuite la minéralisation de la matrice par des dépôts de cristaux d'hydroxyapatite dans les espaces inter-fibrillaires du collagène, ce qui nécessite un apport approprié en calcium et en phosphates. Le transfert du calcium et des ions phosphate du milieu extracellulaire au site de minéralisation se fait par diffusion passive et par transfert actif grâce à des pompes à calcium ou à un système de transport de phosphate dépendant du sodium (Anderson *et al.*, 2005). Un autre mécanisme implique l'ALP synthétisée par les ostéoblastes. L'ALP est une ectoenzyme couplée à la membrane qui hydrolyse les pyrophosphates inorganiques, inhibiteurs de la calcification, augmentant ainsi le taux d'ions phosphates inorganiques. Une balance entre la concentration des pyrophosphates et des phosphates assure une minéralisation adéquate de la matrice (Addison *et al.*, 2007). Enfin, l'ostéoblaste et ses précurseurs présents dans le stroma-médullaire produisent des molécules régulatrices solubles (OPG, RANKL) et des cytokines (M-CSF, TNF- α , IL-1, IL-6 et IL-11). Celles-ci, libérées dans le milieu extracellulaire, agissent sur les cellules qui deviendront des ostéoclastes, contrôlant ainsi la résorption ostéoclastique et la masse osseuse.

1.4.3 Ostéocytes

À la fin du processus de formation osseuse, certains ostéoblastes se transforment en ostéocytes qui sont entièrement entourés par la matrice osseuse minéralisée et demeurent métaboliquement actifs bien qu'ils soient incapables de se diviser. Les ostéocytes sont sensibles aux stimuli mécaniques qui déterminent le besoin en une augmentation ou en une diminution de la formation osseuse dans le processus d'adaptation fonctionnelle ou en cas de fractures. Les ostéocytes sont probablement les cellules qui orientent dans l'espace l'activité des ostéoblastes et ainsi agencent et adaptent l'architecture osseuse afin d'assurer une résistance maximale aux contraintes physiques auxquelles est soumis le tissu osseux.

1.5 Régulation du remodelage osseux

1.5.1 Système RANKL/RANK/OPG

Le RANKL est une protéine liée à la membrane cellulaire exprimée dans de nombreux tissus comme les cellules endothéliales et les lymphocytes T. Dans l'os, RANKL est synthétisé par les cellules mésenchymateuses du stroma-médullaire et par les ostéoblastes (Wada et al., 2006). Les ostéoblastes matures expriment peu de RANKL alors que les cellules du stroma-médullaire l'expriment en quantité importante. La principale action de RANKL est de stimuler la différenciation des ostéoclastes, ainsi que leur maturation et leur protection contre l'apoptose. La différenciation des ostéoclastes est réalisée par une action directe de RANKL en association avec le M-CSF sur les précurseurs ostéoclastiques (Karsenty et Wagner, 2002). L'activation des ostéoclastes a été mise en évidence chez des souris transgéniques dont le gène RANKL est déficient. Ces souris présentent une ostéopétrose sévère caractérisée par une formation osseuse excessive et l'augmentation de la masse osseuse due à l'absence complète d'ostéoclastes (Kong et al., 1999). Le récepteur de RANKL est RANK, une protéine transmembranaire qui appartient à la famille des récepteurs du TNF (Boyce et Xing, 2008). Dans le tissu osseux, RANK est uniquement exprimé par les ostéoclastes et leurs précurseurs. Dans les autres tissus, RANK est surtout exprimé dans les fibroblastes, les cellules dendritiques et les lymphocytes T et B. Lors de contacts cellulaires, l'interaction RANK/RANKL déclenche la transduction de signaux intracellulaires indispensables à la différenciation et à la survie des ostéoclastes (Boyce et Xing, 2007).

L'OPG est un récepteur agissant comme leurre de RANKL sécrété principalement par les ostéoblastes et qui inhibe la différenciation ostéoclastique et la résorption osseuse en se liant à RANKL et en empêchant son action (Fig. 1.8) (Simonet *et al.*, 1997; Tsuda *et al.*, 1997). L'OPG appartient à la famille des récepteurs solubles du TNF Dans le tissu osseux, elle est synthétisée par les ostéoblastes et sa sécrétion augmente d'autant plus que le degré de différenciation des cellules est élevé (Giner *et al.*, 2008). *In vitro*, l'OPG inhibe la différenciation, la survie et la fusion des précurseurs des ostéoclastes, inactive les ostéoclastes matures et accélère leur apoptose (Shiotani *et*



Figure 1.8 : Système RANK-RANKL-OPG

Les ostéoblastes et ostéocytes sécrètent le RANKL qui se lie à son récepteur naturel, RANK sur la surface des ostéoclastes, ce qui mène à leur activation. Les ostéoblastes et les ostéocytes sécrètent également de l'OPG, un récepteur leurre de RANKL qui empêche la liaison de RANKL à RANK et en conséquence l'activation des ostéoclastes. Adapté de Richards *et al.*, 2012.

al.,2002; Simonet et al., 1997). In vivo, les souris surexprimant le gène OPG développent une ostéopétrose sévère (Simonet et al., 1997), tandis que les souris déficientes souffrent d'une grave ostéoporose (Bucay et al., 1998). Toutes les hormones et les facteurs locaux qui agissent sur les ostéoclastes ont une action sur le système RANK-RANKL-OPG. Les facteurs connus pour stimuler la résorption osseuse tels que les PTH, PTHrP, 1,25-dihydroxyvitamine D3, les cytokines IL-1, TNF- α , PGE2, IL-6, IL-11, IL-15, IL-17, IGF1, et les glucocorticoïdes, augmentent l'expression de RANKL par les ostéoblastes et diminuent en même temps l'expression de l'OPG intervenant dans la régulation du ratio RANKL/OPG (Boyce et Xing, 2007; Boyce et Xing, 2008; Suda et al., 1999). Le RANKL et l'OPG sont donc les clés du système agoniste/antagoniste qui régule le devenir des ostéoclastes.

1.5.2 Leptine

La leptine est une hormone qui joue un rôle clé dans la régulation de l'apport énergétique et de la dépense d'énergie, y compris l'appétit et le métabolisme. Elle est principalement exprimée dans le tissu adipeux blanc, mais d'autres organes comme l'estomac, le tissu placentaire, les muscles squelettiques ou les cellules épithéliales mammaires chez la femme qui allaite la produisent également (Bado et al., 1998; Masuzaki et al., 1997; Wang et al., 1998). Le récepteur de la leptine (Ob-R) appartient à la classe I de la superfamille des récepteurs de cytokines qui présente de nombreuses analogies avec le récepteur de l'IL-6. Il a été montré que des épissages alternatifs du gène codant pour le récepteur permettent d'obtenir au moins six isoformes protéiques de tailles différentes (Chua et al., 1997; Tartaglia et al., 1995). La forme longue (Ob-Rb), trouvée essentiellement dans l'hypothalamus, semble être la seule capable de transduction du signal. Il existe des formes tronquées multiples, exprimées dans divers organes ou tissus périphériques (Zhang et al., 2005). L'isoforme courte dépourvue de domaine transmembranaire représente une forme soluble de ce récepteur et joue un rôle dans le transport et dans l'inactivation de la leptine circulante (Tu et al., 2008). Le récepteur de la leptine n'est pas localisé uniquement dans l'hypothalamus. Au niveau périphérique local, il existe de nombreux sites de liaison pour la leptine sur divers organes: foie, cœur, poumon, reins, pancréas, moelle hématopoïétique et sur l'os (Fruhbeck, 2006; Tartaglia et al., 1995). Depuis sa découverte, la leptine a été perçue comme une hormone dont la cible principale était le système nerveux central, à par lequel elle régule de nombreuses fonctions comme l'appétit, la reproduction, ainsi que le métabolisme osseux. La régulation du remodelage de la masse osseuse au niveau central se fait via le système nerveux sympathique, plus particulièrement au niveau du noyau ventromédian de l'hypothalamus. Il apparaît clair que la leptine agit en tant qu'inhibiteur de la formation osseuse via le système nerveux central. La leptine est impliquée dans le

métabolisme osseux de manière systémique via la modulation de certains neurotransmetteurs et de molécules gérant le cycle cellulaire. La régulation centrale inhibitrice de la formation osseuse sous le contrôle de la leptine est dépendante de la stimulation du système nerveux sympathique, agissant directement au niveau des cellules ostéoblastiques exprimant le récepteur β 2-adrénergique (β 2-AR). L'activation de ces récepteurs par la noradrénaline inhibe la formation osseuse. En accord avec ces observations, les souris β 2-ARKO ont une masse osseuse élevée (Ducy *et al.*, 2000a; Ducy *et al.*, 2000b). De plus, par la voie centrale, la leptine module la résorption osseuse. Elle augmente directement le tonus sympathique au niveau du noyau ventro-médian et stimule la formation des ostéoclastes et donc la résorption osseuse. L'injection de leptine au niveau intra-cérébro-ventriculaire cause une baisse de la masse osseuse autant chez les souris déficientes en leptine que chez les souris sauvages (Bartell *et al.*, 2011).

Il a été suggéré que l'effet local de la leptine est plus prononcé que son effet central (Reid et Comish, 2004). L'effet local stimulateur de la leptine est réalisé directement par la liaison de la leptine à ses récepteurs spécifiques, exprimés par les cellules ostéoblastiques. La leptine augmente la prolifération et la différenciation des ostéoblastes (Cornish *et al.*, 2002; Gordeladze *et al.*, 2002), stimule la synthèse de COL-I et de l'OCN (Thomas *et al.*, 1999) qui favorisent la minéralisation osseuse (Reseland *et al.*, 2001). L'administration d'une faible dose de leptine compense la baisse de leptine dans le sérum et prévient une perte osseuse tant au niveau de l'os trabéculaire que de l'os compact (Burguera *et al.*, 2001). Donc, localement la leptine a une action anabolique alors que de manière centrale, elle a un effet antiostéogénique. La leptine, ainsi que d'autres molécules impliquées dans la régulation du métabolisme osseux agissent sur les cellules osseuses et leurs précurseurs aux niveaux local et systémique. Afin de mieux comprendre le mécanisme de la formation osseuse, l'origine des ostéoblastes et la régulation de leur différenciation seront présentés dans les sections suivantes.

1.6 Cellules stromales mésenchymateuses

1.6.1 Différenciation des cellules stromales mésenchymateuses

Les cellules stromales mésenchymateuses (CSM) sont issues de la moelle osseuse, du tissu adipeux et du tissu conjonctif du cordon ombilical (Gronthos et al., 2000; Mareschi et al., 2001; Zuk et al., 2002). La moelle osseuse contient plusieurs types de cellules souches, principalement les cellules souches hématopoïétiques donnant naissance aux différentes lignées de cellules sanguines, les cellules souches mésenchymateuses assurant la fonction de soutien stromal, ainsi qu'un type rare de cellules multipotentes, les multipotent adult progenitor cells (MAPC) (Chamberlain et al., 2007). Les MAPC ont été décrites comme étant les ancêtres de toutes les populations hématopoïétiques et mésenchymateuses présentes dans la moelle. Dans la moelle osseuse, les CSM sont moins nombreuses que les cellules souches hématopoïétiques et représentent de 0,1% à 0,01% des cellules mononucléées totales de la moelle osseuse (Caplan, 2009). Les cellules stromales de la moelle osseuse ont été identifiées initialement par Friedenstein et al., en 1976, qui décrivaient une population de cellules ressemblant à des fibroblastes capables de se différencier dans la voie ostéogénique et donc initialement décrites comme les précurseurs des cellules osseuses (Friedenstein et al., 1976). Des études ultérieures ont montré que les capacités de différenciation de ces cellules s'étendaient aux autres lignées de cellules mésodermiques, incluant ainsi les chondrocytes, les adipocytes, les cellules neuronales et les myoblastes (Fig 1.9) (Chamberlain et al., 2007; Pittenger et al., 1999).



Figure 1.9 : Capacités de différenciation de CSM

Les CSM peuvent se différencier dans une grande variété de types cellulaires, y compris en ostéoblaste, chondrocyte, adipocyte, myocyte et cellule neuronale (Meregalli *et al.*, 2011).

Les cellules doivent répondre aux trois critères suivants pour être considérées comme étant des CSMs : 1) l'adhérence au plastique de culture; 2) l'expression (> 95 %) des antigènes de surface CD73, CD90 et CD105, ainsi que l'absence (98 % des cellules sont négatives) des marqueurs de différenciation hématopoïétiques CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79 α et CMH de classe II et III; 3) la capacité de se différencier en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes (Dominici *et al.*, 2006). Les mécanismes moléculaires gouvernant la différenciation des CSM commencent à être dévoilés. Les cellules mésenchymateuses ont une grande plasticité et sont capables de se différencier en cellules cartilagineuses, osseuses, musculaires ou adipocytaires. L'engagement des CSM dans la différenciation est sous le contrôle de la voie *Wingless type* (Wnt) (Etheridge *et al.*, 2004). Lorsque cette voie est activée, les CSM sont engagées à devenir des ostéoblastes, des chondroblastes ou des myocytes et lorsqu'elle est inhibée, les CSMs deviennent des adipocytes (James, 2013). La différenciation ultérieure dépend de l'implication de facteurs de transcription spécifiques. L'expression de *SRY (sex determining region Y)-box 9 (SOX9)* induit la voie chondroblastique, celle de MyoD, la voie myoblastique, l'expression du peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ^2 induit la différenciation adipocytaire alors que celle de RUNX2 est nécessaire pour l'engagement et la différenciation ostéoblastique (Pittenger et al., 1999). Le RUNX2 est aussi essentiel à la formation osseuse *in vivo* et au maintien de la fonction ostéoblastique au cours de la croissance post natale. Certains effecteurs biologiques et les voies conduisant à l'activation de ces facteurs de transcription ont été identifiés.

1.6.2 Origine des chondrocytes

La différenciation des chondrocytes et des ostéoblastes partage une étape commune ostéo-chondrocytaire, et ensuite une différenciation des deux lignées est conditionnée par l'expression de facteurs de transcription particuliers (Hill *et al.*, 2005). La différenciation chondrocytaire initiale à partir des précurseurs mésenchymateux est sous la dépendance du gène *SOX9* (Fig 1.10). Le facteur SOX9 est impliqué dans le passage de la cellule mésenchymateuse indifférenciée à un progéniteur ostéochondrocytaire et dans la régulation de l'expression des gènes qui codent pour l'agrécane et le COL-II (Lefebvre *et al.*, 1997; Ng *et al.*, 1997). L'ablation totale de SOX9 empêche les condensations mésenchymateuses (Bi *et al.*, 1999). Sa délétion à des stades plus tardifs diminue la prolifération des chondrocytes et l'expression des gènes responsables de l'élaboration de la matrice et de la signalisation *Indian hedgehog* (IHH)/PTH-*related protein*. Les chondrocytes passent alors prématurément au stade hypertrophique (Akiyama *et al.*, 2002). Ceci identifie le *SOX9* comme un gène essentiel à la chondrogenèse.



Figure 1.10 : La régulation de la différenciation des CSM

Les CSM se différencient en différents types cellulaires sous le contrôle de facteurs de transcription spécifiques. L'expression de $PPAR\gamma^2$ induit la différenciation adipocytaire, celle de SOX9 iduit la voie chondroblastique et celle de RUNX2 induit la différenciation ostéoblastique. Adapté de Harada, 2003.

1.6.1.2 Origine des adipocytes

Lorsque les CSM s'engagent dans la voie adipocytaire, l'adipogènese est initiée par l'activation des facteurs de transcription de la famille des *CCAAT/enhancer binding protein* (C/EBP). Les facteurs C/EBP β et C/EBP δ induisent l'expression des *PPAR* γ et *C/EBP* α (Fig. 1.10). L'action conjointe de ces deux facteurs est indispensable à la pleine différenciation et au maintien du phénotype adipocytaire. En effet, le C/EBP α ne peut induire à lui seul l'adipogenèse dans des cellules dans lesquelles le gène du *PPAR* γ a été invalidé (Rosen *et al.*, 2002). PPAR γ existe sous deux formes, nommées PPAR γ 1 et PPAR γ 2, qui diffèrent par leur extrémité N-terminale. Il a été démontré que c'est principalement PPAR γ 2 qui contrôle l'adipogenèse (Ren *et al.*, 2002). Dans la lignée adipocytaire, PPAR γ 2 s'hétérodimérise avec RXR α . L'activation de PPAR γ permettre au complexe PPAR γ -RXR α d'induire la transcription des gènes cibles (Kliewer *et al.*, 1994). PPAR γ intervient dans la différenciation adipocytaire par son action sur la régulation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans le phénotype adipocytaire. Au cours de l'adipogenèse, les cellules subissent des changements morphologiques et augmentent l'expression de protéines servant à leurs principales fonctions.

1.6.1.3 Origine des ostéoblastes

L'ostéogenèse est caractérisée par l'engagement, la prolifération et l'acquisition du potentiel ostéoblastique de cellules ostéoprogénitrices. Les études ont permis de mettre en évidence certains facteurs de transcription essentiels pour l'ostéogenèse, le RUNX2 et l'ostérix (OSX) (Fig 1.10) (Pittenger et al., 1999; Yoshida et al., 2004). L'invalidation de l'un de ces deux facteurs mène à des anomalies graves du squelette et de la croissance osseuse (Komori et al., 1997; Nakashima et al., 2002). Le RUNX2 est un facteur indispensable à un stade tardif de la condensation mésenchymateuse et au début de l'engagement des CSM vers la lignée ostéoblastique (Ducy et al., 1997; Komori, 2010). RUNX2 augmente l'expression des gènes de la matrice osseuse telle que le COL-I, l'ostéopontine, la BSP, l'OCN et la fibronectine (Lian et al., 2006) mais il n'est pas essentiel ensuite au maintien de l'expression de ces gènes. Le niveau d'expression du RUNX2 se diminue et l'expression d'OSX s'augmente lors de la differenciation ostéoblastique (Komori, 2010). L'OSX agit en aval de RUNX2 et est nécessaire dans la différenciation des ostéoblastes tardifs et la croissance osseuse postnatale (Zhou et al., 2010). Tout au long du développement osseux, plusieurs facteurs paracrines, autocrines et endocrines modulent la différenciation ostéoblastique. Les divers facteurs de croissance et hormones tels que les membres de la famille sonic hedgehog (SHH) et IHH, les BMPs, le PTH, le FGF-2, le PDGF, le

vascular endothelial growth factor (VEGF) et les IGF agissent sur la prolifération et la maturation des ostéoblastes (Eriksen, 2010; Qin et al., 2003).

1.7 Voie de signalisation Wnt

1.7.1 Acteurs de la voie Wnt

L'une des voies de signalisation importantes dans le cycle vital des CSM est la voie des Wnt qui contrôle la prolifération, la survie, l'engagement et la différenciation cellulaire (Baron et Kneissel, 2013; Kim et al., 2013). L'activation de la voie Wnt canonique demande une liaison des ligands spécifiques avec un récepteur transmembranaire désigné Frizzled (FZD) (Xavier et al., 2014) et la formation d'un complexe avec un autre récepteur membranaire, le LDL receptor-related protein (LRP) 5 et 6. Cette interaction stimule l'activation des protéines intracellulaires de la famille disheveled (DVL) (Fig.1.11) (Pandur et al., 2002; Westendorf et al., 2004). L'activation de DVL inhibe alors un deuxième complexe intracellulaire composé de l'axine, de la glycogène synthase kinase (GSK) 3, et de la protéine Adenomatose polypose coli (APC) (Lee et al., 2003a). La GSK3 phosphoryle normalement la β caténine et stimule sa dégradation. Une stimulation de la signalisation Wnt inhibe l'activité du complexe Axin/GSK3/APC en provoquant une dissociation de l'APC, ce qui résulte en une augmentation du niveau de la β -caténine cytoplasmatique et nucléaire. Une fois rentrée dans le noyau, la β -caténine s'hétérodimérise avec le T cell factor/lymphoid enhancer-binding factor (TCF/Lef) (Pandur et al., 2002) et, finalement, induit une transcription des gènes qui déterminent la différenciation des CSM (Fig. 1.11B) (Etheridge et al., 2004; Kim et al., 2013).



Figure 1.11 : Voie de signalisation Wnt

A) La signalisation Wnt peut être bloquée par *Wnt inhibitory protein* (WIF-1) et *secreted Frizzled related proteins* (sFRP) ou par l'interaction de LRP5/6 avec un complexe Dickkopf (DKK)/Kremen ou avec la sclérostine (Sost). La phosphorylation de la β -caténine par GSK3 stimule la dégradation de β -caténine B). Le Wnt se lie au récepteur Fzd et inhibe ainsi l'activité du complexe FRAT1/GSK3 par des mécanismes impliquant Axin et DVL. La β -caténine s'accumule dans le cytoplasme et est transportée vers le noyau où elle se lie à TCF/Lef, provoquant la transcription des gènes cibles. Adapté de Baron et Kneissel, 2013

1.7.2 Régulation de la voie Wnt

Le signal Wnt est régulé par divers agonistes et antagonistes comprenant des facteurs sécrétés, des modulateurs transmembranaires et des signaux intracellulaires (Kawano et Kypta, 2003). Les antagonistes sécrétés comme le sFRP, le WIF et le DKK1 agissent différemment sur la voie Wnt. La SOST et le DKK1 affectent seulement la voie Wnt canonique en se liant au co-récepteur LRP5/6 (Fig. 1.11A) (MacDonald et al., 2009), tandis que le sFRP et le WIF bloquent la voie canonique et non-canonique en se liant directement à Wnt (Bovolenta et al., 2008). Le déficit en LRP5 entraîne une ostéoporose chez le rongeur (Kato et al., 2002), les sujets porteurs de mutations inactivatrices de LRP5 souffrent d'une ostéoporose congénitale sévère (Agueda et al., 2011; Goltzman, 2011) tandis que certaines mutations activatrices de LRP5 mènent à une masse osseuse très élevée et une ostéosclérose chez l'humain (Ferrari et al., 2005). L'inhibition de la voie Wnt réduit la prolifération et l'activité ostéoblastique, diminue l'activité de l'ALP, la minéralisation osseuse et bloque de manière indirecte la BMP (Hill et al., 2005; Zhang et al., 2013). Les Norrin et R-spondine (RSPO) sont deux familles des protéines agonistes de la voie Wnt/ β -caténine. Norrin, un membre de la famille TGF- β possède une grande affinité pour la FZD-4, lie également la LRP5/6 et stimule la signalisation Wnt (Smallwood et al., 2007). Les RSPO favorisent la différenciation des ostéoblastes et elles sont fortement exprimées dans le tissu osseux au cours du développement embryonnaire et postnatal (Hankenson et al., 2010). Elles présentent une synergie avec les récepteurs FZD et LRP6 (Kazanskaya et al., 2004).

1.7.3 Voie Wnt et ostéogenèse

La régulation du passage des CSM dans la voie ostéogénique se base essentiellement sur la voie Wnt qui favorise la différenciation ostéoblastique à partir des progéniteurs ostéochondraux, stimule la prolifération des ostéoblastes et augmente la survie des ostéoblastes et des ostéocytes (Bodine et Komm, 2006). Tout d'abord, la signalisation Wnt/ β -caténine joue un rôle primordial dans l'engagement des CSM dans la voie ostéoblastique au cours du développement embryonnaire (Day *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2005). L'activation de la voie Wnt-canonique stimule aussi la différenciation des ostéoblastes déjà formés lors de l'ossification endochondrale (Day *et al.*, 2005). Cet effet sur l'activité ostéoblastique est réalisé grâce à la formation de complexes avec des facteurs de transcription TCF/Lef. Il a été aussi démontré que la β -caténine agit indirectement sur l'ostéoclastogenèse par l'intermédiaire d'OPG. La β -caténine et TCF se lient au promoteur du gène de l'OPG et favorisent son expression (Glass *et al.*, 2005). Par conséquent, la signalisation Wnt/ β -caténine peut avoir deux effets sur le remodelage osseux : la stimulation de la formation et la suppression de la résorption osseuse.

1.8 Ostéoporose

Comme il a été mentionné plus haut, le maintien de la masse osseuse est assuré grâce à un équilibre entre la destruction et la formation du tissu osseux. Le renouvellement de l'os est indispensable au maintien des qualités mécaniques et métaboliques de notre squelette. Un déséquilibre du remodelage osseux mène finalement à une diminution de la masse osseuse (ostéopénie) et au risque potentiel de fractures, suite à des traumatismes minimes (ostéoporose).

1.8.1 Étiologie

L'ostéoporose est une maladie caractérisée par une faible masse osseuse et une détérioration du tissu osseux (Fig. 1.12). Cette condition entraîne une plus grande fragilité osseuse et des risques de fractures, particulièrement de la hanche (col fémoralae), de vertèbres lombaires et du poignet (carpes) (WHO, 2003).

L'ostéoporose apparaît lorsque la perte de tissu osseux et de minéraux est plus rapide que la formation de nouveaux tissus osseux.



Figure 1.12 : Représentation schématique d'os sain et d'os ostéoporotique

L'ostéoporose altère la micro-architecture du tissu osseux et mène à l'amincissement des trabécules osseuses et à l'augmentation des espaces entre celles-ci. Tiré de: http://juicing-for-health.com/fun-free-recipes/juicing-by-health-conditions/osteoporosis-symptoms.html

L'ostéoporose touche près de 2 millions d'habitants du Canada. Une femme sur quatre et au moins un homme sur huit âgés de plus de 50 ans souffrent d'ostéoporose (http://www.osteoporosecanada.ca/losteoporose-et-vous/donnees-et-statistiques-sur-osteoporose/). Comme les femmes ont une masse osseuse 30% plus faible que celle des hommes, elles sont plus vulnérables à l'ostéoporose à tous âges. Cependant, à partir de 65 ou 70 ans, la diminution de la masse osseuse est à peu près la même pour les deux sexes. Les causes exactes de l'ostéoporose ne sont pas identifiées, mais il existe des facteurs qui sont susceptibles d'augmenter le risque d'ostéoporose (Raisz, 2005). La diminution des niveaux d'œstrogènes mène à une déminéralisation osseuse accélérée après la ménopause (Guglielmi *et al.*, 2011). Une carence en œstrogènes augmente le niveau de résorption osseuse par les ostéoblastes. Les femmes dont

la ménopause a été précoce (avant 45 ans) courent un risque accru de développer de l'ostéoporose (Lee *et al.*, 2003b). Certaines mutations génétiques semblent être liées à un risque héréditaire d'avoir une faible masse osseuse et de subir plus de fractures (Liu *et al.*, 2014). Les facteurs liés au mode de vie, comme le tabagisme, une consommation d'alcool abusive, la prise de médicaments comme les corticostéroïdes, ou la sédentarité contribuent également à la déminéralisation osseuse (Compston, 2009; van Staa *et al.*, 2000). Une carence en calcium et en vitamine D ainsi que l'hyperparathyroïdie secondaire sont associées à une diminution de la masse osseuse chez les personnes âgées (Lips, 2001). Les récentes études épidémiologiques lient l'inflammation et les déséquilibres métaboliques tels que l'hyperlipidémie et l'athérosclérose à l'ostéoporose (Lacativa et Farias, 2010; Parhami, 2003).

1.8.2 Diagnostique

La détermination de facteurs de risque et la densitométrie osseuse de la colonne vertébrale et/ou du col du fémur permettent d'estimer la probabilité de développer l'ostéoporose (Guglielmi *et al.*, 2011). Une autre approche diagnostique et de suivi de l'efficacité thérapeutique est la mesure des marqueurs sériques du remodelage osseux (Delmas *et al.*, 2000). L'ALP est le marqueur de la formation osseuse le plus fréquemment utilisé. Le dosage immunologique de l'ALP osseuse sérique est sensible à l'augmentation du remodelage osseux après la ménopause et permet de révéler l'efficacité thérapeutique (Woitge *et al.*, 1996). L'OCN est synthétisée par les ostéoblastes et incorporée dans la matrice osseuse extra-articulaire mais pas dans sa totalité. Ainsi, une partie de cette molécule se trouve dans la circulation sous une forme libre où elle peut être dosée en radio-immunologie (Brown *et al.*, 1984). Lorsqu'un ostéoblaste est en activité, il produit une molécule de COL-I qui va être incorporée dans le tissu osseux. Il libère en même temps une molécule d'un propeptide d'extension N-terminale (PINP) et C-terminale (PICP). Par ailleurs, ces

peptides reflètent la synthèse du collagène pas uniquement dans l'os mais aussi au niveau d'autres tissus (Seibel, 2000). La phosphatase acide 5a résistante au L-tartrate (TRAP) est spécifique au tissu osseux et reflète l'activité de la résorption osseuse (Halleen *et al.*, 2000). Cette enzyme est augmentée dans plusieurs maladies osseuses caractérisées par un accroissement du remodelage.

1.8.3 Traitements

Le principal objectif des traitements pharmacologiques de l'ostéoporose vise la réduction des fractures. Certains de ces médicaments sont aussi employés pour diminuer le risque de développer l'ostéoporose. Le traitement actuel de l'ostéoporose se base sur l'utilisation de substances anticataboliques qui inhibent la résorption osseuse, telles que les bisphosphonates ou les oestrogènes (Marie et Kassem, 2011; Montagnani, 2014). Les agents anaboliques représentés essentiellement par la PTH ont aussi un effet bénéfique sur l'os (Hodsman *et al.*, 2005). De nouveaux agents sont venus s'ajouter dernièrement à l'arsenal thérapeutique. Ils visent à cibler différentes molécules impliquées dans le métabolisme osseux. On peut noter les inhibiteurs de la voie RANKL (Bone *et al.*, 2011), les anticorps contre les antagonistes de la voie Wnt (Glantschnig *et al.*, 2010; Padhi *et al.*, 2011) ou les différents facteurs de croissance (Marie et Kassem, 2011; Montagnani, 2014).

1.9 Lipoprotéines

1.9.1 Métabolisme des lipoprotéines

Les lipoprotéines permettent le transport des lipides dans l'organisme et sont des particules globulaires de haute masse moléculaire, constituées d'un noyau de triglycérides (TG) et d'esters de cholestérol (EC) entouré d'une monocouche d'apolipoprotéines (apo), de phospholipides et de cholestérol libre. Pendant leur

voyage dans la circulation sanguine, les lipoprotéines subissent des modifications complexes qui affectent leurs composition, structure et fonction. Les lipoprotéines sont classées selon leurs densités, et sont réparties en chylomicrons, lipoprotéines de très basse densité (VLDL), lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), LDL et lipoprotéines de haute densité (HDL) (Havel, 1987).

Les chylomicrons sont les lipoprotéines les plus grosses avec une densité de 0,93 g/ml et sont composés majoritairement de TG (86%) et possèdent à leur surface l'apoA et l'apoB-48. Sous l'action de la lipoprotéine lipase (LPL), les TG sont hydrolysés en glycérol et en acides gras absorbables par les cellules hépatiques et les tissus périphériques (Kersten, 2014). L'hydrolyse des TG des chylomicrons provoque la formation secondaire de HDL discoïdales formées de phospholipides, de cholestérol, d'apoC et d'apoA. Les résidus de chylomicrons contenant des TG, EC et enrichis en apoB48 et apoE se fixent au foie par les LRP1 (Dominiczak et Caslake, 2011). Dans le foie, des lipases hépatiques dégradent les TG en acides gras qui servent principalement à la synthèse de nouveaux TG.

La fonction principale des HDL est d'assurer le transport inverse du cholestérol c'està-dire l'élimination du cholestérol par le foie à partir des cellules ou des tissus non hépatiques (Rothblat et Phillips, 2010). Au contact des cellules périphériques, les pré-HDL, provenant de la sécrétion hépatique d'apoA-I pauvrement associée à des lipides, captent le cholestérol libre excédentaire *via* la protéine transporteur cassette liant l'ATP 1 (ABCA1). Cette protéine appartient à la superfamille des transporteurs cassette liant l'ATP (ABC). Ces protéines ont pour fonction le transport de diverses molécules (ions, peptides, glucides et molécules organiques complexes) à travers la membrane nécessitant l'hydrolyse d'ATP (Geourjon *et al.*, 2001). Les ABC assurent la fixation et l'hydrolyse de l'ATP, fournissant ainsi l'énergie nécessaire pour le transport du substrat. La captation de cholestérol libre par les pré-HDL mène à la production des HDL de tailles croissantes qui progressivement s'enrichissent en triglycérides et en apoE, et donnent les HDL2. Les HDL2 se fixent ensuite au SR-BI hépatique qui permet d'internaliser une partie de leurs EC dans l'hépatocyte alors que les autres composants des HDL sont ensuite transférées aux VLDL et apparaissent éventuellement dans les LDL (Thuahnai *et al.*, 2004). La majorité du cholestérol libéré par les cellules extrahépatiques est transportée au foie à des fins d'excrétion biliaire. Ce mécanisme constitue le transport inverse du cholestérol.

Les VLDL, synthétisées dans le foie, sont riches en TG (50%) et possèdent des apoB100, apoC et de l'apoE. Dans la circulation les TG des VLDL sont soumis à l'action de la LPL et les acides gras ainsi libérés sont livrés aux tissus. À la suite de cette délipidation, les VLDL deviennent des IDL (Musliner *et al.*, 1986). La majorité des IDL sont captées au niveau du foie par les récepteurs de LDL (rLDL). La fraction restante perd son apoE, est hydrolysée par la lipase hépatique et forme des LDL riches en EC qui ne possèdent plus que l'apoB100. Les LDL en circulation chez l'humain représentent environ 70 % du total de toutes les lipoprotéines (Dammerman et Breslow, 1995). Il faut noter que chez les souris se sont les HDL et les VLDL qui prédominent dans la circulation (Yin *et al.*, 2012). La clairance des LDL est assurée par l'interaction de l'apoB100 avec le rLDL (Hospattankar *et al.*, 1986). Les niveaux élevés de LDL dans la circulation contribuent à la pathogenèse de l'athérosclérose (revue dans Frohlich et Al-Sarraf, 2013). Il semble que l'oxydation des LDL soit le facteur déterminant de leur athérogénicité (Esterbauer *et al.*, 1992).

1.10.2 Oxydation des LDL

Les LDLox possèdent une affinité accrue pour les SR (Fluiter et van Berkel, 1997). Les processus d'oxydation des LDL sont des phénomènes excessivement complexes et ils se déroulent en différentes étapes. De hauts taux plasmatiques de LDL favorisent leur oxydation (Morel *et al.*, 1984; Steinberg, 1997). Les lipides polyinsaturés subissent en premier l'oxydation par les radicaux libres. Ensuite, l'oxydation se propage à d'autres lipides, aux molécules de cholestérol et à l'apoB menant à leur dégradation et à la génération d'aldéhydes et de cétones (Steinberg, 1997). Les cétones sont éliminées, mais les aldéhydes se lient aux résidus lysine de l'apoB100, entrainant une augmentation de sa charge négative et une modification de son activité physiologique (Fong *et al.*, 1987). Les LDL ainsi modifiées ne peuvent plus être reconnues par le rLDL et vont être captées par les SR des macrophages et les cellules du foie (Young et McEneny, 2001). Il existe une grande variété de LDLox. Outre leur diversité structurale, les LDLox sont caractérisées par des différences fonctionnelles. On distingue les LDL moyennement oxydées qui entraînent la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires et les LDL fortement oxydées qui sont cytotoxiques et mènent à la formation de cellules spumeuses (Berliner *et al.*, 1995).

1.9 Récepteurs scavenger

Outre les facteurs prédisposant à l'ostéoporose tels la maladie de Crohn, l'hyperparathyroïdie primaire, l'hypogonadisme et le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires et l'athérosclérose sont également associées à une faible masse osseuse (Parhami, 2003). Cette corrélation suggère l'existence de facteurs de risque communs et les études récentes proposent l'hyperlipidémie et l'hypercholestérolémie comme mécanismes possibles du développement de l'ostéoporose (Tintut, 2004; Yamaguchi *et al.*, 2002). Les SR contribuent au métabolisme des lipides natifs et modifiés et ainsi sont impliqués dans la pathogenèse des dyslipidémies et possiblement de l'ostéoporose. La famille des SR comprend plusieurs récepteurs transmembranaires qui présentent une grande variété structurelle (Fig 1.13).



Figure 1.13 : Les classes de SR

Les SRs sont répartis en différentes classes selon leur structure (Terpstra et al., 2000).

Ils sont répartis en différentes sous-familles en fonction de leur capacité à lier des lipoprotéines modifiées et de leurs caractéristiques structurelles et de leurs domaines fonctionnels (Horiuchi *et al.*, 2003; Krieger, 1997; Prabhudas *et al.*, 2014). Récemment, une nouvelle définition et nomenclature des SR qui comprend onze classes de A à J et O à été proposée (Prabhudas *et al.*, 2014). Selon cette définition, les SR sont des récepteurs de surface cellulaire qui lient généralement plusieurs ligands et favorisent l'élimination des particules étrangères ou des particules endogènes altérées. Ils fonctionnent souvent par des mécanismes qui comprennent l'endocytose, la phagocytose, l'adhésion et la signalisation qui mènent finalement à l'élimination des substances nocives ou dégradées (Prabhudas *et al.*, 2014). Chaque

classe de SR possède différentes propriétés; cependant, il est clair que dans un environnement sain, leur rôle est de libérer le corps des produits qui pourraient être potentiellement dangereux tels que les agents microbiens, les cellules apoptotiques et les lipoprotéines modifiées.

1.11 Cluster of differentiation (CD36)

Malgré que la présence de CD36 dans le tissu osseux soit bien établie (Brodeur et al., 2008; Carron et al., 2000), son rôle physiologique dans le métabolisme osseux est encore inconnu. CD36 est considéré comme un récepteur multi-ligands multifonctionnel impliqué dans plusieurs aspects de la biologie et notamment dans le métabolisme des lipoprotéines. Les macrophages internalisent et accumulent massivement dans leur cytoplasme certaines composantes des LDLox via les SR, dont le CD36 (Endemann et al., 1993). Chez les souris doublement déficientes en apoE et en CD36, l'internalisation des LDLox par les macrophages est diminuée de 60% (Febbraio et al., 1999; Febbraio et al., 2000). Les souris déficientes en CD36 (Cd36KO) sont hyperlipidémiques et possèdent des concentrations élevés de TG-VLDL et d'acides gras libres (Goudriaan et al., 2003; Sandoval et al., 2010). Certaines études ont suggéré une contribution des lipides et des lipides oxydés dans la pathophysiologie de l'ostéoporose (Rajamannan et al., 2003; Parhami, 2003). Les femmes possédant une faible masse osseuse et atteintes d'ostéoporose ont de plus hauts niveaux de LDL-cholestérol que les femmes saines (Demir et al., 2008; Tarakida et al., 2011). En plus, il a été démontré que les LDL faiblement oxydées inhibent la différenciation des ostéoblastes in vitro (Parhami et al., 1997). Donc, l'implication de CD36 dans le métabolisme des lipoprotéines et le rôle de ces dernières dans les maladies ostéoporotiques font de CD36 une cible intéressante dans l'étude de la biologie du tissu osseux. Ses sites d'action et ses effets physiologiques sont nombreux et ils peuvent directement ou indirectement influencer le tissu osseux.

Pour cela, une compréhension des mécanismes d'action de CD36 dans l'os est primordiale. Donc, les sections suivantes portent sur la structure de CD36, son rôle physiologique et sa régulation dans les différents tissus, ainsi que les conséquences de la déficience en CD36 chez l'humain et la souris.

1.11.1 Identification de CD36

CD36 est un récepteur membranaire intégral qui fait partie de la grande famille des SR de classe B. CD36 a été découvert sur la membrane des plaquettes (Bolin, 1981; Okumura et Jamieson, 1976) et a été appelé plus tard glycoprotéine (GP) IV (Tandon *et al.*, 1989). Dans les années 1980, CD36 a été identifié comme l'antigène réagissant avec l'anticorps OKM5 des monocytes et fut alors nommé antigène OKM5 (Shaw, 1987; Talle *et al.*, 1983). Plus tard, il a été déterminé que GPIV et l'antigène OKM5 étaient les mêmes protéines et les termes GPIV et antigène OKM5 ont été remplacés par CD36 (Asch *et al.*, 1987; Harmon et Abumrad, 1993). CD36 a ensuite été découvert en tant que récepteur de COL, de LDLox (Endemann *et al.*, 1993), de la trombospondine (TSP) et comme le transporteur des acides gras (FAT) dans les adipocytes (Abumrad *et al.*, 1993). CD36 est aussi connu sous l'appellation SCARB3, GP88 et gpIIIb.

1.11.2 Gène CD36, ses transcrits alternatifs et mutations

Le gène *CD36* est localisé sur le chromosome 7q11.2 chez l'humain et sur les chromosomes 4 et 5 chez le rat et la souris respectivement. Le gène *CD36* est constitué de 15 exons, mais seulement une partie de l'exon 3, les exons 4 à 13 et une partie de l'exon 14 codent pour la protéine CD36 (Armesilla et Vega, 1994; Fernandez-Ruiz *et al.*, 1993). Les exons restants forment les régions 5' et 3' non traduites (régions 5'-UTR et 3'-UTR) (Fig. 1.14). La transcription des cinq premiers

exons (1a, 1b, 1c, 1e et 1f) est contrôlée par trois promoteurs alternatifs et leur activité dépend du tissu et de l'état physiologique (Andersen *et al.*, 2006; Armesilla et Vega, 1994; Sato *et al.*, 2002). L'exon 1a est plus présent dans le tissu adipeux, le cœur, les muscles squelettiques, les monocytes et moins présent dans le foie; tandis que le transcrit contenant l'exon 1b est plus présent dans le tissu adipeux et les monocytes (Andersen *et al.*, 2006). L'induction de l'expression de *CD36* par un de ses promoteurs semble être dépendante du genre. L'expression de *CD36* dans le foie est plus élevée chez les rats femelles que chez les mâles (Cheung *et al.*, 2007). Les modifications de l'expression de *CD36* et de son premier exon reflètent la capacité du tissu à répondre aux besoins physiologiques grâce à l'utilisation des différents promoteurs. Même s'il existe différents transcrits de CD36, ils contiennent tous la même séquence codante, et donc produisent la même protéine CD36.



Figure 1.14 : Représentation schématique du gène CD36

Le gène *CD36* est composé de 15 exons, dont 12 (une partie de l'exon 3, les exons 4 à 13 et une partie de l'exon 14) codent pour la protéine CD36. La région nontranscrite en 5' est constituée des exons 1a, 1b, 1c, 1e, 1f, 2 et d'une partie de l'exon 3 et la région non-transcrite en 3' est constituée d'une partie de l'exon 14 et de l'exon 15 (Collot-Teixeira *et al.*, 2007). Dans les cas exceptionnels, il existe une diversité fonctionnelle pour CD36 en raison de l'épissage alternatif. Une protéine CD36 tronquée a été isolée à partir des cellules humaines de leucémie érythroïde. Cette forme tronquée est causée par la délétion des exons 4 et 5 qui sont responsables de la production d'une protéine de 369 acides aminés dont les acides aminés 41 à 143 sont manquants (Tang *et al.*, 1994). Différentes modifications telles que les substitutions de nucléotides, des délétions, des insertions courtes, des duplications, des réarrangements de nucléotides, des séquences répétitives capables d'affecter l'expression ou l'activité de CD36 ont été signalées dans plusieurs études (Aitman *et al.*, 2000; Imai *et al.*, 2002; Kashiwagi *et al.*, 1994; Lepretre *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2001).

Il existe des mutations qui engendrent la déficience en CD36 chez l'humain. Cinq mutations sont responsables de 90% de tous les cas de déficience de type I définie par une absence de CD36 sur les monocytes et les plaquettes. Parmi elles, la mutation C478T dans l'exon 4 est la plus fréquente et cause 50% de la déficience chez la population asiatique (Kashiwagi *et al.*, 2001). Cette substitution mène à un remplacement de la proline-90 par une sérine ce qui perturbe la transition du précurseur à sa forme mature et réduit considérablement l'expression de CD36 (Kashiwagi *et al.*, 1995). Les mutations responsables de la déficience de type II définie par l'absence de CD36 seulement sur les plaquettes sont nombreuses et certaines d'entre elles sont identiques aux mutations de la déficience de type I (Yanai *et al.*, 2000). Jusqu'à présent, les causes moléculaires ou génomiques de la déficience de type II ne sont pas bien comprises, ce qui suggère que l'expression de CD36 dans les plaquettes est contrôlée par des facteurs héréditaires spécifiques (Imai *et al.*, 2002; Kashiwagi *et al.*, 2001).

1.11.3 Structure de CD36

Le gène *CD36* code pour une protéine fortement glycosylée constituée de 472 acides aminés avec un poids moléculaire de 78 à 88 kDa et dont la forme non glycosylée est de 53 kDa (Febbraio *et al.*, 2001). Sa structure générale est composée de cinq domaines distincts: un long domaine extracellulaire, deux régions transmembranaires et deux courtes queues cytoplasmiques en N- et C-terminales (Fig. 1.15) (Connelly *et al.*, 1999; Gruarin *et al.*, 2000).



Figure 1.15 : Structure de CD36 et principaux sites de liaison

CD36 est un récepteur transmembranaire localisé dans les radeaux lipidiques de la membrane plasmique. Son large domaine extracellulaire contient de multiples sites de N-glycosylation et différents domaines de liaison. L'extrémité C-terminale est important pour la cascade de signalisation intracellulaire (Collot-Teixeira *et al.*, 2007).

Le domaine extracellulaire est approximativement de 400 acides aminés et il est fortement glycosylé. Dix sites potentiels de glycosylation ont été prédits et neuf d'entre eux sur les résidus asparagine ont été confirmés (Hoosdally *et al.*, 2009). La glycosylation de CD36 est nécessaire pour le transport efficace du récepteur vers la membrane cellulaire, mais elle ne modifie pas sa liaison avec les ligands (Hoosdally *et al.*, 2009). CD36 est constitutivement phosphorylé sur la thréonine 92 et son degré de déphosphorylation est important pour la liaison avec certains ligands et la signalisation ultérieure (Asch *et al.*, 1993). Les séquences N- et C-terminales intracellulaires, respectivement de 7 et 13 acides aminés, contiennent chacune deux résidus de cystéine permettant l'ancrage des queues dans la couche interne de la membrane (Tao *et al.*, 1996). La palmitoylation de ces quatre cystéines assure la maturation de CD36 dans le réticulum endoplasmique, régule son incorporation dans des radeaux lipidiques et la captation de LDLox (Thorne *et al.*, 2010). L'ubiquitination de CD36 aux lysines 469 et 472 le rend sensible à la dégradation (Smith *et al.*, 2008).

1.11.4 Sites de liaison de CD36

La partie extracellulaire de CD36 forme une boucle qui possède plusieurs domaines fonctionnels pour la liaison aux différents ligands et contient une poche hydrophobe entre les acides aminés 184-204 qui est probablement associée au feuillet externe de la membrane cellulaire (Collot-Teixeira *et al.*, 2007). D'abord, le domaine localisé entre les acides aminés 155-183 est impliqué dans la liaison des LDLox (Endemann *et al.*, 1993), ainsi que des HDL, LDL et VLDL natives (Calvo *et al.*, 1998), des Col-I et IV (Tandon et al., 1989), des acides gras à longue chaîne (AGLC) (Abumrad *et al.*, 1993), des produits terminaux de glycation (AGEs), des cellules apoptotiques (Savill *et al.*, 1993), du growth hormone releasing peptide (GHRP), de l'hexaréline (Bodart *et al.*, 2002) et d'un dérivé de la famille GH (EP80317) (Demers *et al.*, 2003)

2004). Un autre motif fonctionnel est appelé le domaine CLESH (séquence d'homologie CD36, LIMP-II, EMP, SR-BI) et est composé des résidus d'acides aminés 93-120 et identifié comme un site de reconnaissance des TSP-1 et -2 et de cellules apoptotiques (Navazo *et al.*, 1996; Sipes *et al.*, 1999). Un dernier domaine d'intérêt, délimité par les acides aminés 146-164, permet la reconnaissance d'une protéine exprimée spécifiquement à la surface des érythrocytes parasités par *Plasmodium* (Pl.) *falciparum* (Oquendo *et al.*, 1989). L'extrémité C-terminale de la queue cytoplasmique est impliquée dans l'internalisation des bactéries Grampositives (Stuart *et al.*, 2005).

1.11.5 Distribution tissulaire de CD36

CD36 est exprimé dans une variété de tissus et de cellules. Il a tout d'abord été identifié à la surface des plaquettes humaines (Okumura et Jamieson, 1976) puis sur les monocytes/macrophages (Talle et al., 1983). CD36 est également présent sur la surface des autres types de cellules sanguines et leucocytes, tels que les érythrocytes (van Schravendijk et al., 1992), les lymphocytes B (Konig et al., 1995), les cellules dendritiques (Juhlin, 1989) et les microglies (Coraci et al., 2002; Husemann et al., 2002). CD36 est exprimé dans les tissus sujets à un flux important d'acides gras libres et sur les cellules impliquées dans le métabolisme des lipides comme les adipocytes (Abumrad et al., 1993), les hépatocytes (Maeno et al., 1994), les myocytes, les cardiomyocytes (Bodart et al., 2002; de Oliveira Silva et al., 2008; Steinbusch et al., 2011), les entérocytes de l'intestin grêle (Chen et al., 2001), les cellules gustatives (Laugerette et al., 2005), les pneumocytes (Guthmann et al., 1999) et les cellules endothéliales (Knowles et al., 1984). Le récepteur est présent à la surface d'autres types cellulaires tels que l'épithélium pigmentaire rétinien (Ryeom et al., 1996) et respiratoire (Atsuta et al., 1997), les cellules des reins, du pancréas (Noushmehr et al., 2005), de la rate (Zhang et al., 2007), de l'estomac (Chen et al.,

2001), des gonades (Gillot et al., 2005), des glandes surrénales (Zhang et al., 2003), de la prostate (Vallbo et Damber, 2005) et du noyau ventromédian de hypothalamus (Le Foll et al., 2009). On le retrouve exprimé dans les cultures primaires d'ostéoblastes murins et humains, ainsi que les lignées ostéoblastiques murine (MC3T3-E1) et humaines (MG-63 et SaOS2) (Carron et al., 2000; Brodeur et al., 2008).

1.11.6 Ligands et fonctions biologiques de CD36

Comme CD36 est un récepteur pour de multiples ligands dans plusieurs cellules et tissus, il est impliqué dans de nombreux aspects de la biologie. Le rôle spécifique de CD36 dépend grandement du ligand et du type de cellule dans laquelle il est exprimé. CD36 est présumé être un récepteur d'endocytose pour la plupart de ses ligands, à l'exception des AGLC. Les AGLC sont une source principale d'énergie pour les cellules et peuvent diffuser passivement à travers la membrane plasmique. Toutefois, leur transfert est plus efficace par le moyen de FATP1 à 6, de la protéine de liaison d'acides gras (FABP) et de CD36. CD36 assure le transfert des acides gras dans les adipocytes, le cœur et les muscles squelettiques (Abumrad *et al.*, 1993). Il est possible que pour une translocation des AGLC, CD36 seul ou conjointement avec la FABP cytoplasmique concentre les AGLC à la surface cellulaire pour favoriser leur diffusion passive ou encore que CD36 interagit directement avec les AGLC afin de les transporter activement à travers la membrane plasmique (Bonen *et al.*, 2002).

Mis à part le transport des acides gras, CD36 situé sur les cellules gustatives est impliqué dans la sensation du goût de gras dans l'alimentation (Laugerette *et al.*, 2005). Par contre, pour une détection correcte, il est nécessaire que les triglycérides soient hydrolysés pour libérer les acides gras. Par la suite, les acides gras ainsi libérés se lient à CD36, ce qui provoque une augmentation du calcium intracellulaire, une libération de neurotransmetteurs, l'activation des neurones gustatifs dans le cerveau et une stimulation rapide de la sécrétion du jus pancréatique (El-Yassimi *et al.*, 2008). La détection de la graisse dans la cavité buccale par CD36 permet donc au système digestif de se préparer à la consommation du repas gras. Une diminution de l'expression de CD36 sur les cellules gustatives entraîne l'absence de signaux de satiété après un repas gras et favorise le développement de l'obésité chez les rats et les souris nourris *ad libitum* (Schwartz *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011).

CD36 est impliqué dans l'athérosclérose, plus précisément en lien avec les dérivés des LDLox, les acides hydroxyoctadécadiénoïque (HODE) -9 et -13 et dans la formation des cellules spumeuses (Endemann et al., 1993; Febbraio et al., 2001). La captation et l'internalisation des LDLox conduisent à de complexes changements au niveau de la transcription ce qui provoque la différenciation des monocytes en macrophages et la différenciation de ces derniers en cellules spumeuses (Endemann et al., 1993). Ces changements incluent même une augmentation de l'expression de ce récepteur via l'activation du récepteur nucléaire PPARy qui se lie à son élément de réponse spécifique sur le promoteur du gène CD36 (Tontonoz et al., 1998). L'expression augmentée de CD36 mène à une endocytose massive des LDLox et, par conséquent, à un développement accru en cellules spumeuses (Rahaman et al., 2006). Le degré d'oxydation des LDLox influence le niveau d'expression de CD36. Les LDL faiblement et moyennement oxydées entrainent la plus importante expression de CD36, tandis que les LDL fortement oxydées n'ont pas d'effet sur l'expression de CD36 (Kavanagh et al., 2003). La délétion du gène Cd36 chez les souris déficientes en apoE soumises à une diète athérogène mène à une réduction significative de la taille des lésions aortiques. Cette réduction est associée à une diminution de 60% de l'internalisation des LDLox par les macrophages (Febbraio et al., 1999; Febbraio et al., 2000).

Le rôle de CD36 dans l'angiogenèse implique sa liaison avec la TSP-1. La TSP-1 est considérée comme une protéine multifonctionnelle en raison de sa capacité à se lier à au moins une douzaine de différents récepteurs (Bornstein, 1995). La TSP-1 a été d'abord identifiée comme un inhibiteur endogène de l'angiogenèse tumorale en rendant les cellules endothéliales insensibles aux multiples stimulateurs de vascularisation (Good et al., 1990). Plus tard, l'implication de CD36 dans la médiation du signal anti-angiogénique de TSP-1 a été découverte (Jimenez et al., 2000). La liaison de TSP-1 avec CD36 induit une inhibition de la prolifération, de la migration cellulaire et de la formation de tubes capillaires menant à l'activation de l'apoptose des cellules endothéliales (Dawson et al., 1997; Jimenez et al., 2000). Les études ont permis d'identifier certains effecteurs apoptotiques telles que la Fyn kinase, la caspase-3 et des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) (Jimenez et al., 2000) impliqués dans la cascade de transduction médiée par CD36. Donc, l'interaction de CD36 avec la TSP-1 agit comme un régulateur négatif de l'angiogenèse, jouant ainsi un rôle important dans la croissance tumorale, l'inflammation, la réparation des blessures et aussi dans d'autres processus pathologiques impliquant la néovascularisation.

L'interaction de CD36 avec la TSP-1 est aussi associée à l'hémostase et à l'agrégation des plaquettes. CD36 est indirectement associé à la liaison des plaquettes au collagène de la paroi artérielle endommagée *via* sa liaison directe à la TSP-1 (Legrand *et al.*, 1991). Cette interaction augmente l'activation de l'agrégation des plaquettes et la stabilisation du thrombus déjà formé (Kuijpers *et al.*, 2014).

Normalement, les vaisseaux sanguins sont absents sur la cornée ; cependant, une néovascularisation de la cornée peut se produire lors du port prolongé de lentilles de contact, de l'inflammation, d'un traumatisme et ou de troubles de la vision. CD36 contribue au maintien d'une avascularisation de la cornée en inhibant la néovascularisation. En effet, les souris déficientes en *Cd36* expriment moins de TSP-

1 et davantage de VEGF, ce qui conduit à l'activation de la néovascularisation de la cornée (Mwaikambo *et al.*, 2006).

CD36 lie également la β -amyloïde fibrillaire et joue un rôle important dans l'initiation de la réponse inflammatoire lors de la maladie d'Alzheimer (Stewart *et al.*, 2010). Ce récepteur est nécessaire à l'activation des macrophages et des cellules microgliales par la β -amyloïde et à la production par ces cellules d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), de TNF- α , de l'IL-1 β et d'autres chimiokines qui induisent la chimiotaxie (El Khoury *et al.*, 2003).

La phagocytose est essentielle à l'élimination des cellules apoptotiques ou sénescentes, des agents infectieux et des produits nocifs ou toxiques (Dhariwala et Anderson, 2014; Savill *et al.*, 1989). CD36 des macrophages et des cellules dendritiques intervient dans la phagocytose des cellules apoptotiques en reconnaissant la phosphatidylsérine (Savill *et al.*, 1993) et les composants des lipides oxydés (Greenberg *et al.*, 2008) sur la surface membranaire. CD36 de l'épithélium pigmentaire rétinien est impliqué dans la phagocytose des fragments du segment externe des bâtonnets ce qui est indispensable à la vision normale (Ryeom *et al.*, 1996). Il participe aussi dans la phagocytose des érythrocytes infectés par *Pl. falciparum* (Patel *et al.*, 2004).

CD36 est impliqué dans la reconnaissance de l'acide lipotéichoïque des bactéries Gram-positives et des lipopolysaccharides (LPS) des bactéries Gram-négatives. À la suite de la liaison avec des composants des cellules bactériennes, CD36 forme un complexe avec l'hétérodimère *Toll like receptor-2* (TLR2)/TLR6, ce qui mène au déclenchement de la réponse immunitaire et à la sécrétion de cytokines (Stuart *et al.*, 2005). Lorsque les érythrocytes sont infectés par *Pl. falciparum*, ils expriment à leur surface une protéine d'adhésion *Pl. falciparum erythrocyte membrane protein 1* (PfEMP1) qui lie CD36 des cellules endothéliales (Baruch *et al.*, 1997). Les érythrocytes infectés s'adhèrent alors plus facilement à la paroi vasculaire et contribuent au développement de l'hémolyse des globules rouges et de l'anémie sévère (Oquendo *et al.*, 1989).

1.11.7 Voies de signalisation activées par les ligands de CD36

Bien qu'il reste beaucoup de détails inconnus sur le mécanisme d'action de CD36, certaines voies de signalisation impliquant des ligands spécifiques ont été étudiées. Un point commun de la signalisation de CD36 dans les plaquettes, les macrophages, les cellules endothéliales micro-vasculaires, les cellules microgliales et les cellules gustatives est l'interaction de la queue C-terminale avec les SRC kinases FYN, LYN et YES, et les sérine/thréonine kinases de la famille MAPK (El-Yassimi et al., 2008; Jimenez et al., 2000; Moore *et al.*, 2002; Rahaman et al., 2006). Cette interaction est importante pour l'apoptose, la migration cellulaire, l'inflammation et la formation de cellules spumeuses.

Une liaison de CD36 des cellules endothéliales au TSP-1 entraîne une association avec FYN et sa phosphorylation, ce qui à son tour mène à la phosphorylation de la p38 MAPK, de *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) et de la caspase-3 (Jimenez et al., 2000). Par la suite, il y a induction des ligands de FAS et du TNF- α , ce qui induit l'apoptose et l'inhibition de l'angiogenèse (Rege *et al.*, 2009; Volpert *et al.*, 2002).

L'activation de CD36 dans les macrophages par les LDLox est assurée par la SRC kinase LYN et les MAPK JNK et p38. Il a été démontré que CD36 forme un complexe avec les kinases LYN et MEKK2 et que l'activation de JNK par CD36 est nécessaire pour le transport des LDLox et la formation des cellules spumeuses (Rahaman *et al.*, 2006). Les protéines de la famille Vav sont les substrats pour FYN et LYN et sont considérées comme un autre facteur essentiel à la formation des

cellules spumeuses (Rahaman et al., 2011). Les partenaires de voies de signalisation des MAPK et des SRC incluent les molécules d'adhésion focale, y compris les tyrosines kinases PyK 2 et une kinase d'adhésion focale (FAK). Par exemple, l'internalisation des LDLox mène à l'activation des SRC kinases qui à leur tour interagissent directement avec la FAK qui subit la phosphorylation et l'activation prolongée (Park et al., 2009b). Cette activation, de concert avec la génération des ROS, renforce la polymérisation de l'actine, augmente l'expansion cellulaire et inhibe la migration des macrophages qui se retrouvent alors prisonniers de la plaque d'athérome. Comme mentionné précédemment, la stimulation de PPARy par les composants des LDLox augmente l'expression de CD36 en induisant la formation d'une boucle d'autorégulation positive. Cette activation est stimulée par plusieurs kinases telles que les AKT, la protein kinase C (PKC) et p38 qui ont un effet direct sur le PPARy (Feng, 2000; Munteanu et al., 2006). De plus, l'activation de la PKC suite à l'interaction LDLox-CD36 va également activer le facteur nucléaire kappa B (NF-KB) (Lipsky et al., 1997) qui déclenche la production de cytokines inflammatoires (Janabi et al., 2000) comme les TNF- α/β , l'IL-1 β , l'IL-6 et les interférons β et γ , ce qui augmente l'inflammation locale de la plaque athérosclérotique.

La liaison de l'acide linoléique à CD36 des cellules gustatives induit la phosphorylation des SRC kinases FYN et YES (El-Yassimi *et al.*, 2008). Cette activation mène à une augmentation de calcium intracellulaire et à la sécrétion de neurotransmetteurs, de la 5-hydroxytryptamine et de la noradrénaline.

L'induction de la réponse pro-inflammatoire par les bactéries ou les érythrocytes parasités par *Pl. falciparum* demande une hétérodimérisation de CD36 avec le TLR 2, 4 ou 6 et l'activation de la voie de signalisation MyD88/IRAK4 menant à la stimulation de NF- κ B et à la production de cytokines (Erdman *et al.*, 2009; Stuart et al., 2005).

La β -amyloïde lie un complexe formé par le récepteur CD36 et l'intégrine β 2 à la surface des microglies et initie une cascade de signalisation qui implique les kinases de la famille SRC telles que LYN et FYN, et MAPK p44/42, menant aux effets inflammatoires (Moore *et al.*, 2002). La migration des microglies vers la plaque et la régulation de la réorganisation microgliale dépendent de l'activation de p130Cas, de Pyk2 et de paxilline (Stuart *et al.*, 2007). Un autre mécanisme d'action de CD36 dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer implique l'inhibition de la voie de signalisation de l'oxyde nitrique (NO) *via* son interaction avec la β -amyloïde. Cette interaction provoque une diminution de la production de la guanylate cyclase soluble et de la guanosine monophosphate cyclique et mène à l'abolition de l'effet neuroprotecteur du NO (Miller *et al.*, 2010).

1.11.8 Régulation de l'expression de CD36

La régulation de l'expression de CD36 a largement été étudiée dans les monocytes/macrophages, les adipocytes, les muscles et quelques autres types cellulaires. Elle est complexe et implique des divers médiateurs solubles, des molécules d'adhérence de la surface cellulaire et des récepteurs nucléaires, dont le principal est le PPAR γ (Huh *et al.*, 1995; Tontonoz et al., 1998; Yesner *et al.*, 1996). La distribution tissulaire et cellulaire de CD36, ainsi que le stade de maturation de la cellule, suggèrent une régulation au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel et traductionnel (Huh *et al.*, 1996; Nicholson *et al.*, 2000; Prieto *et al.*, 1994; Tontonoz et Nagy, 1999). Le récepteur nucléaire PPAR γ régule le programme de différenciation des adipocytes et est bien connu comme un régulateur transcriptionnel de CD36 (Teboul *et al.*, 2001). L'activation de PPAR γ par les glitazones dans le tissu adipeux de souris est capable d'augmenter l'expression de CD36 (Sato *et al.*, 2002). L'activation directe du PPAR γ sur les monocytes/macrophages humains par les 9- et
13-HODE augmente le niveau de transcription de CD36 (Tontonoz et al., 1998). L'IL-4 sécrétée par les lymphocytes-T active des 12/15-lipoxygénases qui génèrent la synthèse de 13-HODE et de l'acide 15-hydroxyéicosatétraénoïque à partir des acides linoléique et arachidonique respectivement (Huang et al., 1999). Cette activation fournit des ligands au PPAR γ et induit l'expression de CD36 par le biais d'une PKC (Feng et al., 2000). Certains ligands tels que les facteurs de croissance TGF-B1 et TGF-\u03b32 inhibent l'expression de CD36, agissant comme les répresseurs transcriptionnels du gène PPARy suite à sa phosphorylation par une MAPK (Han et al., 2000). D'autres cytokines telles que l'IFN-y et l'IL-10 ont aussi un effet sur l'expression de CD36. Dans les monocytes, l'IFN-y diminue l'expression de CD36 (Nakagawa et al., 1998), tandis que l'IL-10 augmente son expression et celle d'ABCA1 (Han et al., 2009). Tel que mentionné précédemment l'ABCA1 joue un rôle clé dans le métabolisme des HDL et du transport inverse du cholestérol. D'autres récepteurs nucléaires sont également capables de contrôler l'expression de CD36. L'activation de récepteur X de rétinoïdes (RXR) augmente l'expression de CD36 en absence ou lors de l'inhibition de PPARy (Han et Sidell, 2002; Moore et al., 2001). Le RXR régule (après l'hétérodimérisation avec le liver X receptor) l'expression de gènes impliqués dans la synthèse, le transport et l'efflux de cholestérol (Souidi et al., 2004). Un autre élément, le PPARa, tel que mentionné précédemment, semble également réguler positivement l'expression de CD36. L'exposition de macrophages humains aux hydroperoxydes d'esters de cholestérol de LDL movennement oxydées augmente la liaison de PPARa au promoteur proximal du gène CD36 (Jedidi et al., 2006). L'hyperglycémie induit l'oxydation de LDL, ce qui contribue au stress oxydatif et au dysfonctionnement des cellules endothéliales microvasculaires, ce qui rend les patients diabétiques susceptibles de développer de l'athérosclérose. Le glucose élevé augmente la transcription du gène CD36 dans les cellules endothéliales (Griffin et al., 2001) et les monocytes (Sampson et al., 2003) de patients diabétiques. Chez les rats diabétiques, l'expression de CD36 est augmentée dans de nombreux organes, y compris le tissu adipeux, l'intestin et le

cœur (Chen *et al.*, 2006). Les AGLC ont également un effet sur l'expression de CD36. Ils sont capables d'induire l'expression de CD36 dans les pré-adipocytes en réduisant son expression dans les cellules différenciées (Sfeir *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2007).

Dans le muscle squelettique, une façon principale de contrôler le niveau d'expression de CD36 est la régulation de son mouvement des compartiments intracellulaires vers la membrane plasmique (Huh et al., 1996; Luiken *et al.*, 2003; Muller *et al.*, 2002). Ce type de régulation se produit en réponse à une contraction musculaire et à l'augmentation du transport des acides gras ou suite à la stimulation par l'insuline (Ibrahimi *et al.*, 1999; Jeppesen *et al.*, 2011; Luiken et al., 2003; Luiken *et al.*, 2002). Un apport élevé en glucose mène aussi à une augmentation de la transcription du gène *CD36* et du métabolisme oxydatif des acides gras dans les cellules endothéliales et les cardiomyocytes humains (Farhangkhoee *et al.*, 2005).

1.11.9 Déficience en CD36

Tel que déjà décrit, il existe deux types de déficience en CD36 chez l'humain: le type I, dans lequel ni les plaquettes, ni les monocytes/macrophages n'expriment CD36 et le type II caractérisé par une déficience seulement au niveau des plaquettes (Kashiwagi *et al.*, 1995; Kashiwagi *et al.*, 1994). Entre 2 et 3 % des populations japonaise, thaïe et africaine présentent une déficience en CD36 contre moins de 0,3% pour les descendants européens et américains (Ikeda *et al.*, 1989; Yamamoto *et al.*, 1990). Le type II est prédominant dans la population afro-américaine et asiatique (3 à 4% de chaque population) et est extrêmement rare chez les caucasiens (Yamamoto *et al.*, 1994). Une diminution de la capture des AGLC par le cœur a été observée chez les patients atteints de déficience en CD36 de type I (Tanaka et al., 2001; Tanaka *et al.*, 1997). Comme le métabolisme des acides gras au niveau cardiaque est le système majeur de production d'énergie en condition aérobique, une déficience en CD36 pourrait être reliée à la pathogenèse des cardiomyopathies (Kushiro *et al.*, 2005; Tanaka et al., 1997). Dans l'étude de l'équipe de Hirano (Hirano *et al.*, 2003), la déficience en CD36 a été associée à certaines caractéristiques du «syndrome métabolique», telles que l'augmentation du taux de triglycérides et de glucose, une diminution de HDL-cholestérol et de l'hypertension. Les patients avec la déficience en CD36 semblent avoir plus des maladies athérosclérotiques graves (Yuasa-Kawase *et al.*, 2011). Par ailleurs, la liaison et la fonction d'adhésion des plaquettes déficientes en CD36 (déficience de type II) demeurent normales (Imai *et al.*, 2002). Il n'y pas de donnée concernant l'état du tissu osseux chez les personnes déficients en CD36. Une seule étude de l'expression des gènes cibles de 7 femmes souffrant d'ostéoporose due à de l'ostéarthrite primaire démontre une augmentation de CD36 dans le tissu osseux (Balla *et al.*, 2008).

Pour étudier le rôle de CD36 *in vivo*, un modèle de souris Cd36KO a été créé (Febbraio *et al.*, 1999). Ce modèle a été créé dans l'optique de révéler l'implication de CD36 dans la biologie des monocytes/macrophages, l'homéostasie des lipides et surtout dans la pathogenèse de l'athérosclérose. Les souris Cd36KO ont un métabolisme des lipoprotéines et des acides gras modifié tels que révélée par une augmentation du niveau des triglycérides et acides gras libres dans la circulation (Febbraio *et al.*, 1999), ainsi qu'une diminution de la captation des acides gras dans les muscles et une augmentation de leur internalisation dans le foie (Goudriaan *et al.*, 2003). Les souris doublement déficientes en Cd36 et en *apoE* présentent une diminution de 76% des lésions aortiques, de la captation de LDLox par les macrophages et de la formation de cellules spumeuses par rapport aux souris uniquement déficientes en *apoE* (Febbraio *et al.*, 2000). L'absence de CD36 protège de manière significative les souris *apoE*KO contre l'agrégation excessive des plaquettes et la formation de thrombi (Podrez *et al.*, 2007). De plus, les souris Cd36KO ont un nombre réduit de microparticules endothéliales incorporées dans les

thrombi et un plus long temps d'occlusion thrombotique des vaisseaux (Ghosh *et al.*, 2008). CD36 est aussi lié au métabolisme énergétique (Coburn *et al.*, 2000; Hajri *et al.*, 2007). Les souris *Cd36*KO consomment moins de nourriture et leur taux métabolique est plus faible que celui des souris WT (Hajri *et al.*, 2007). De plus, elles utilisent davantage le glucose pour la production d'énergie et en conséquence elles sont hypoglycémiques (Febbraio *et al.*, 1999; Goudriaan *et al.*, 2003). Les voies catabolique et anabolique sont reliées par les métabolites du métabolisme intermédiaire tels que le pyruvate, le nicotinamide adénine dinucléotide H (NADH) ou encore l'acétyl-coenzyme A (CoA). L'activité de l'acétyl-CoA synthétase dans les muscles, le cœur, le foie et le tissu adipeux des souris *Cd36*KO n'est pas affectée (Coburn *et al.*, 2000). Les souris *Cd36*KO présentent une diminution du poids corporel, accompagnée d'une réduction de la masse de tissu adipeux et d'une diminution du nombre et du volume des adipocytes (Vroegrijk *et al.*, 2013). Il n'y pas de données concernant le niveau d'activité physique des souris *Cd36*KO.

1.12 Problématiques, hypothèse et objectifs

Une perte de la partie minérale du tissu osseux mène à la fragilisation des os et au développement de l'ostéoporose qui n'a habituellement pas de symptômes et qui se manifeste souvent par l'apparition de fractures (Lane, 2006). Les fractures liées à l'ostéoporose constituent un problème majeur considérant un nombre important de personnes qui souffrent d'une invalidité permanente et l'augmentation non négligeable du taux de morbidité/mortalité après une fracture. Grâce aux découvertes sur les mécanismes moléculaires impliqués dans le processus de la perte de masse osseuse, un nombre croissant de possibilités thérapeutiques sont disponibles actuellement (Montagnani, 2014). Malgré l'ajout de nouveaux agents, Santé Canada prévoit une hausse marquée des coûts liés au traitement des fractures ostéoporotiques au cours des prochaines années. Les travaux visant à mieux comprendre le

métabolisme osseux sont toujours nécessaires afin de découvrir de nouvelles cibles et de développer de nouveaux agents thérapeutiques.

Récemment, la présence des récepteurs de la famille SR-B et, entre autres, de CD36 sur les cellules osseuses et l'implication de SR-B dans la captation sélective des EC et de l'œstrogène par les ostéoblastes ont été démontrées (Brodeur et al., 2008). Cette découverte ouvre une nouvelle piste d'étude du métabolisme osseux.

CD36 est grandement impliqué dans divers processus physiologiques ainsi que dans certains états pathologiques, telles que l'athérosclérose, la thrombose et l'inflammation. En plus, le rôle spécifique de CD36 dans la panoplie de tissus et de cellules est amplement élucidé (Silverstein, 2009; Silverstein et Febbraio, 2009). Étant donné la capacité de CD36 d'intervenir dans le métabolisme des lipides et l'implication de ces derniers dans la pathophysiologie de l'ostéopénie et de l'ostéoporose, nous nous sommes intéressés au rôle de ce récepteur dans le tissu osseux et plus particulièrement dans la biologie des ostéoblastes, les cellules primordiales pour la formation osseuse. Dans ce contexte, l'utilisation du modèle de souris déficientes globalement en CD36 offre un moyen pertinent afin de mieux comprendre le rôle de CD36 dans le métabolisme osseux.

En considérant la présence de CD36 sur les cellules ostéoblastiques, nous avons émis 1'hypothèse que ce récepteur pourrait avoir un rôle dans le métabolisme osseux. En particulier, nous pensions que ce rôle pourrait être en lien avec la formation du tissu osseux, possiblement dans la biologie des ostéoblastes et de leurs précurseurs. Étant donné le niveau élevé de lipides chez les souris Cd36KO, ainsi que l'hyperlipidémie chez les patients souffrants de maladies ostéopéniques, on s'attendait à ce que les souris Cd36KO aient un phénotype de faible masse osseuse qui pourrait être dû à l'altération de l'ostéoformation par les ostéoblastes. On a donc voulu caractériser le phénotype osseux des souris Cd36KO, décrire le comportement *in vitro* des CSM

dérivées de ces souris ainsi qu'explorer les facteurs associés à l'ostéogenèse. Ainsi, le but principal de ce projet est de déterminer le rôle de CD36 au niveau des fonctions des ostéoblastes dans le processus du remodelage osseux.

Ce projet de recherche a été entrepris selon les trois objectifs spécifiques suivants : 1) étudier les particularités de la microarchitecture osseuse chez les souris Cd36KO et les marqueurs sanguins du métabolisme osseux.

2) déterminer le rôle de CD36 dans la physiologie des ostéoblastes au niveau de leur maturation, leur prolifération et leur survie, en étudiant les facteurs qui influencent le métabolisme osseux et l'expression des gènes ostéoblastiques dans les CSM de souris Cd36KO.

 3) déterminer l'effet d'une déficience en CD36 sur le potentiel de différenciation des CSMs et sur la voie de signalisation Wnt.

1.13 Approche expérimentale

Tous les travaux expérimentaux réalisés dans le cadre de la thèse ont été effectués en utilisant deux souches de souris, les souris de type sauvage (WT) et les souris Cd36KO.

Pour étudier la microarchitecture osseuse, une technique de micro tomographie (μ CT) et des analyses d'histologie du tissu osseux ont été utilisées, et les niveaux des marqueurs sanguins du métabolisme osseux ont été mesurés par des essais immunoenzymatiques (ELISA). Afin de comprendre l'influence de l'absence de CD36 sur la physiologie des ostéoblastes, des mesures de prolifération, d'apoptose, ainsi que de marqueurs phénotypiques ont été faites par cytofluorescence. De même l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme osseux a été etudiée par amplification par réaction de polymérisation en chaine (RT-PCR). Le rôle de CD36 dans la biologie des CSM et dans la voie de signalisation Wnt a été étudié par des méthodes de biologie cellulaire (prolifération, apoptose) et moléculaires (RT-PCR).

Les analyses statistiques des données expérimentales, exprimées selon les moyennes \pm écarts-moyens, ont été faites avec le logiciel GraphPad Prism5 et les comparaisons entre deux groupes de données ont été réalisées avec le test-t de Student. Une valeur de P<0,05 fut considérée comme significative.

CHAPITRE II

LOW-BONE-MASS PHENOTYPE OF DEFICIENT MICE FOR THE CLUSTER OF DIFFERENTIATION 36 (CD36)

Olha Kevorkova, Corine Martineau, Louise Martin-Falstrault, Jaime Sanchez-Dardon, Louise Brissette, Robert Moreau

PLoS ONE, 2013, Volume 8, Issue 10, E77701

2.1 Avant-propos

Les objectifs principaux de ce chapitre sont : 1) évaluer le phénotype de tissu osseux et 2) caractériser les fonctions des ostéoblastes chez les souris déficientes en Cd36. De nombreux travaux ont montré le rôle de CD36 dans de multiples cellules et tissus mais jusqu'à présent, il n'y avait aucune étude qui porte sur l'importance de CD36 dans le tissu osseux.

Dans le tissu osseux, nous avons étudié l'incidence de l'ablation de *Cd36* sur les paramètres de micro architecture des vertèbres et de la partie trabéculaire et corticale des fémurs et des tibias. Nous avons également évalué les paramètres d'histomorphométrie de l'os et les niveaux de marqueurs sanguins du métabolisme osseux. Les études *in vitro* nous ont permis de caractériser le comportement des CSM dérivées de la moelle osseuse de souris *Cd36*KO ainsi que l'expression de certains gènes impliqués dans le métabolisme osseux.

Ces travaux ont été réalisés sur les souris WT et *Cd36*KO. Les souris *Cd36*KO ont déjà été utilisées pour caractériser le rôle de CD36 dans divers processus biologiques, ce qui en font un très bon modèle d'étude pour le métabolisme osseux.

J'ai été impliquée dans toutes les facettes de ces travaux. Corine Martineau et moi même avons participé aux expériences qui ont permis d'évaluer les paramètres de micro architecture de fémur et de tibia et d'histomorphométrie. Jaime Sanchez-Dardon et moi-même avons réalisé les expériences de cytométrie en flux. Louise Martin-Falstrault a été responsable de la gestion des colonies de souris. Avec la participation de la Dre Louise Brissette et du Dr Robert Moreau j'ai élaboré les figures, analysé les résultats et rédigé le manuscrit.

2.2 Résumé

Le tissu osseux est en perpétuel renouvellement et le maintien de la masse osseuse dépend de l'équilibre entre les processus de résorption et de formation. Nous avons rapporté l'expression des SR-BI, SR-BII et de CD36 dans les ostéoblastes mais leurs rôles physiologiques dans le métabolisme osseux demeurent inconnus. Afin d'élucider le rôle de CD36 dans le métabolisme osseux, nous avons déterminé le phénotype osseux de souris Cd36KO et caractérisé les fonctions cellulaires des ostéoblastes Cd36KO. Le poids des souris Cd36KO était significativement plus faible que celui des souris WT, mais aucune différence significative n'a été retrouvée dans la longueur des fémurs et des tibias entre les souris WT et Cd36KO. L'analyse microtomographique de l'architecture osseuse a révélé une faible masse osseuse chez les souris Cd36KO des deux genres. L'analyse de la partie trabéculaire du fémur de souris Cd36KO âgées de 1 à 6 mois a montré une diminution du volume osseux, une augmentation de la séparation trabéculaire et une réduction du nombre de trabécules par rapport aux souris WT; des modifications similaires ont été remarquées pour les vertèbres lombaires. Les niveaux plasmatiques d'OCN et de PINP, deux marqueurs de la formation osseuse, étaient significativement plus faibles chez les souris Cd36KO que chez les souris WT, alors que les niveaux plasmatiques des marqueurs de la résorption osseuse étaient similaires. En accord avec ces résultats, l'étude histologique des tissus osseux a révélé une diminution du périmètre de surface couvert par les ostéoblastes et une réduction du taux de formation osseuse. La caractérisation in vitro des cellules stromales et des ostéoblastes dérivés de la moelle osseuse de souris Cd36KO a montré une réduction de la prolifération des cellules en culture et de leur survie, ainsi qu'une diminution de l'expression génique de Runx2, d'Osx, de la Bsp et d'Ocn. Nos résultats indiquent l'importance de CD36 dans le métabolisme osseux et dans les fonctions des ostéoblastes afin d'assurer une formation osseuse adéquate.

2.3 Abstract

Bone tissue is continuously remodeled by bone cells and maintenance of its mass relies on the balance between the processes of resorption and formation. We have reported the expression of numerous scavenger receptors, namely scavenger receptor (SR) class B type I and II (SR-BI and SR-BII), and CD36, in bone-forming osteoblasts but their physiological roles in bone metabolism are still unknown. To unravel the role of CD36 in bone metabolism, we determined the bone phenotype of Cd36 knockout (Cd36KO) mice and characterized the cell functions of osteoblasts lacking Cd36. Weights of Cd36KO mice were significantly lower than corresponding wild-type (WT) mice, yet no significant difference was found in femoral nor tibial length between Cd36KO and WT mice. Analysis of bone architecture by microcomputed tomography revealed a low bone mass phenotype in Cd36KO mice of both genders. Femoral trabecular bone from 1 to 6 month-old Cd36KO mice showed lower bone volume, higher trabecular separation and reduced trabeculae number compared to WT mice; similar alterations were noticed for lumbar vertebrae. Plasma levels of osteocalcin (OCN) and N-terminal propeptide of type I procollagen (PINP), two known markers of bone formation, were significantly lower in Cd36KO mice than in WT mice, whereas plasma levels of bone resorption markers were similar. Accordingly, histology highlighted lower osteoblast perimeter and reduced bone formation rate. In vitro functional characterization of bone marrow stromal cells and osteoblasts isolated from Cd36KO mice showed reduced cell culture expansion and survival, lower gene expression of osteoblastic Runt-related transcription factor 2 (Runx2) and osterix (Osx), as well as bone sialoprotein (Bsp) and osteocalcin (Ocn). Our results indicate that CD36 is mandatory for adequate bone metabolism, playing a role in osteoblast functions ensuring adequate bone formation.

2.4 Introduction

Bone is a dynamic tissue that undergoes continual remodeling through the coordinated processes of bone resorption and formation. The equilibrium of both processes ensures the preservation of skeleton structural integrity and mineral homeostasis of the organism (Eriksen, 2010). Osteoclasts and osteoblasts are specialized cells which respectively break down old bone tissue and promote the formation of a novel bone matrix. Osteoblasts derive from bone marrow mesenchymal precursor cells that sequentially differentiate into proliferating preosteoblasts, bone matrix-producing osteoblasts, and eventually into osteocytes embedded in the bone matrix under the control of specific transcription factors (Lian et al., 2006). Differentiated osteoblasts synthesize and secrete type I collagen (COL-I), the main bone matrix protein, and also regulate bone mineralization by expressing alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin (OCN). In addition, these cells continuously orchestrate bone remodeling by regulating the activation and differentiation of cells from the monocyte/macrophage lineage into osteoclasts (Eriksen, 2010), required for the resorption process. Any imbalance between the functions of resorptive and formative cell populations that leads to excessive bone resorption or inadequate formation response results in loss of bone density, lower bone mass and increased risk of bone fractures (Raisz, 2005) which are the main diagnostic criteria of osteoporosis (WHO, 1994).

Several etiologic factors have been identified for the development of osteoporosis such as hormonal state particularly low oestrogen level and hyperparathyroidism, exposure to certain medications (such as glucocorticoids), calcium deficiency due to low dietary calcium intake or impaired intestinal absorption as well as vitamin D deficiency, compromised antioxidant conditions, hematologic disorders, gastrointestinal and metabolic diseases (Lane, 2006; Raisz, 2005; Shen *et al.*, 2009). A number of recent clinical and experimental studies have linked disorders of the lipoprotein metabolism and atherosclerosis with the development of osteoporosis (Banks *et al.*, 1994; Hjortnaes, 2010) suggesting that both pathologies share contributory factors. Comprehension of the lipoprotein metabolism has beneficiated from the study of lipoprotein receptors such as SR superfamily and specifically SR class A (SRA), and class B (SR-BI and CD36) (Silverstein et Febbraio, 2009). We have recently reported the expression of SR-BI, SR-BII, and CD36 in osteoblasts (Brodeur *et al.*, 2008), however their physiological roles in bone metabolism are still unknown.

CD36 is an integral membrane glycoprotein and its expression has been demonstrated in platelets, monocytes/macrophages, megakaryocytes, microvascular endothelial cells, adipocytes, hepatocytes, cardiac and skeletal myocytes, and bone cells (Brodeur et al., 2008; Carron et al., 2000; Silverstein et Febbraio, 2009). CD36 binds a variety of extracellular ligands and thus, this receptor has been implicated in a broad range of biological functions. In endothelial cells, CD36 has been implicated in angiostatic response and apoptosis through binding of thrombospondin-I (Jimenez et al., 2000). CD36 has been involved in innate and adaptive immunity due to its ability to recognize lipid and lipoprotein components of bacterial cell wall such as lipoteichoic acid and lipopolysaccharides (Baranova, 2008). CD36 has been associated with adherence to microvascular endothelial cells and phagocytosis of *Plasmodium* falciparum-parasitized erythrocytes by macrophages (McGilvray et al., 2000). In relation to lipid and lipoprotein metabolism, CD36 promotes long-chain fatty acid transport and intracellular lipid accumulation (Abumrad et al., 1993). Moreover, low density lipoproteins (LDL) when oxidized (oxLDL) enhance CD36 expression in macrophages which leads to endocytosis of oxLDL, formation of cholesterol loaded foam cells and initiation of atherosclerotic lesions (Febbraio et al., 2001). Additionally, CD36-mediated oxLDL binding by macrophages induces the production of inflammatory cytokines, which generates local inflammation in atherosclerotic plaque (Silverstein et Febbraio, 2009). Moreover, atherosclerotic lesions in Cd36 deficient (KO) mice are reduced when compared to apolipoprotein

E/Cd36 double KO, associating proatherogenic properties to CD36 (Febbraio et al., 2000). Furthermore, plasma levels of cholesterol, free fatty acid and triacylglycerol (Febbraio et al., 1999) increase in Cd36KO mice and such dysfunctions of lipid metabolism have been associated to impaired lipid uptake and decreased lipolysis (Coburn et al., 2000; Goudriaan et al., 2005). CD36 has been implicated in platelet aggregation and thrombus formation in dyslipidemic state (Chen et al., 2008; Ghosh et al., 2008; Podrez et al., 2007), as Cd36KO mice show reduction of thrombotic vessels occlusion and aggregation of platelets in hyperlipidemic state (Podrez et al., 2007). A recent study using Cd36KO mice demonstrated the involvement of CD36 in the antiangiogenic response related to the pathophysiology of choroidal involution and corneal neovascularisation (Houssier, 2008; Mwaikambo, 2008). Cornea of Cd36KO mice showed increased age-dependent neovascularisation with subsequent enhancement of inflammation and expression of angiogenic factors (Mwaikambo, 2008). In contrast, choroid of Cd36KO mice was characterized by increased avascular area with severe thinning of choroid and diminished expression of angiogenic factors (Houssier, 2008).

Given the implication of CD36 in a broad range of physiological functions and its expression by osteoblasts, the current study was undertaken to unravel the role of CD36 in bone metabolism by determining the bone phenotype of Cd36KO mice and characterizing the cell functions of osteoblasts lacking CD36.

2.5 Materials and methods

2.5.1 Animals

*Cd36*KO mice were obtained from Dr Maria Febbraio (Cleveland, OH, USA) and were backcrossed at least 7 times to wild-type (WT) C57BL/6J mice purchased from Charles River (Boston, MA, USA). One to 6 month-old mice were used and the

animals were provided with a standard mouse chow diet and drinking water. *Cd36* genotyping was done by PCR as described previously (Luangrath *et al.*, 2008) using specific primers for the targeted allele (5'-CAGCTCATACATTGCTGTTTATGCATG and 3'-CGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATC). This study was conducted according to protocols approved by the Animal Care and Use Committee of Université du Québec à Montréal.

2.5.2 Plasma analysis

Blood was collected into heparin collection tubes (68 USP, BD Bioscience) by cardiac puncture of anaesthetised mice, prior to their euthanasia. Blood was centrifuged for 30 min at 2000g and 4°C, and plasma was recovered and stored at -80°C until analysis. Plasma levels of glucose, calcium, phosphate and ALP activity were determined using QuantiChrom Assay Kits (BioAssay System, Hayward, CA, USA). Plasma concentrations of total cholesterol, high density lipoprotein (HDL)-and LDL-cholesterol were measured using EnzyChrom AF HDL and LDL/VLDL Assay Kit (BioAssay System) according to the manufacturer's instructions. Plasma levels of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) isoform 5b, N-terminal propeptide of type I procollagen (PINP) and C-terminal telopeptide of Col-I (CTX) were measured by EIA assays (IDS Inc, Fountain Hills, AZ, USA). OCN detection in plasma was done using a mouse EIA kit (Biomedical Technologies Inc, Stoughton, MA, USA) according to the manufacturer's instructions.

2.5.3 Documentation of bone architecture

MicroCT analyses were performed using a Skyscan 1172c X-ray computed microtomograph (Skyscan, Kontich, Belgium) equipped with an X-ray tube working

at 70 kV/100 µA. Below the epiphyseal growth plate to end of metaphysis of femura and whole lumbar vertebrae (L5) of WT and Cd36KO mice were scanned at a $5\mu m$ resolution, a 180° rotation with a 0.5° rotation increment and a 0.5mm aluminum filter. A stack of 2D X-ray shadow projections was reconstructed to obtain crosssectional images using NRecon software (Skyscan), and subjected to morphometric analyses using CTAn software (Skyscan). Trabecular parameters were measured at the metaphysis (a total of 300 slices were selected) and cortical parameters were determined at the femoral diaphysis (a total of 100 slices were selected), and 200 slices were chosen either side of the L4-L5 vertebrae. The three dimensional morphometric parameters of bone microarchitecture were calculated using CTAn (Skyscan) software. The parameters measured included bone volume fraction (bone volume/total volume (BV/TV)), trabecular thickness (Tb.Th), number (Tb.N), and separation (Tb.Sp) for trabecular bone and vertebrae, and BV, cortical thickness (Cort.Th), endocortical perimeter (Ec.Pm) and periosteal perimeter (Ps.Pm) for cortical bone. Three-D renderings were generated from these volumes of interest using CTvol software (Skyscan).

2.5.4 Bone histochemistry

Twenty mg of calcein (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) per kg body weight were injected intraperitoneally to 4-week-old mice on days 9 and 2 prior to euthanasia (day 0). The femura were dissected free of soft tissue, fixed for 16 h in 4% paraformaldehyde at 4° C and rinsed in phosphate buffer saline (PBS; 1 mM CaCl₂, 2.7 mM KCl, 1.4 mM KH₂PO₄, 0.8 mM MgCl₂.6H₂O, 137 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7.4). The femora were embedded in a mixture of polymethylmethacrylate (PMMA) as described by Erben (Erben, 1997), 6 µm sections were cut with a Thermofisher rotary HM 360 microtome. Staining for ALP (Millipore, Billerica, MA, USA) and TRAP activity (K Assay, Dako, Burlington, Ontario, Canada) was carried out at 37° C in a Coplin jar placed in a moist chamber as described previously (Valverde-Franco *et al.*, 2004). Bone sections were visualized with an inverted phase contrast microscope (Nikon Eclipse Ti, Mississauga, Ontario, Canada) and analyzed with ImageJ software to determine relative ALP-positive osteoblast perimeter (Ob.Pm) and number of TRAP positive osteoclasts (#Oc/BS). Calcein labeling was visualized with a Nikon FN1 Eclipse inverted fluorescence microscope and used to evaluate mineralizing surface (MS/BS), mineral apposition rate (MAR) and bone formation rate (BFR).

2.5.5 Primary cultures of osteoblasts

For primary cultures of bone marrow mesenchymal stromal cells (MSC) and osteoblasts, 4-8 week old animals were euthanatized and femora and tibiae from WT and Cd36KO mice were collected and carefully cleaned from adherent tissues. Bones were broken in half and centrifuged 5 min at 2500 rpm for the collection of bone marrow cells. Cell pellets were re-suspended in culture medium, seeded in 100-mm dishes (Sarstedt, Montreal, Quebec, Canada), and allowed to adhere for 48 h in Minimal essential medium, alpha modification (α -MEM) with phenol (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) supplemented with 20% fetal bovine serum ((FBS) NorthBio. Toronto. Ontario, Canada). L-glutamine (Invitrogen) and penicillin/streptomycin (Invitrogen). Non-adherent cells were discarded and adherent cells were washed with PBS and cultured in supplemented α -MEM with FBS until confluent. The resulting MSC cultures were lifted by incubation in 0.05% trypsin-0.02% EDTA solution (Invitrogen) and cell phenotype was analysed by flow cytometer (Becton-Dickinson). The cell suspensions were washed in PBS and a total of 1 X 10⁵ cells were double-stained for 15 min at room temperature with monoclonal antibodies against mouse CD105 conjugated to phycoerythrin (PE) and mouse CD73 conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC) (BioLegend, San Diego, CA).

Afterwards, fluorescence was measured in 10,000 cells per sample by flow cytometry and analysis was performed using Cell-Quest 3.1 software (Becton-Dickinson). The mouse mesenchymal cell line C3H10T1/2 (ATCC, cultured in DMEM medium (Sigma)) was used as positive control for MSC antigens. Remaining cells were seeded in appropriate plates for subsequent experiments. For primary cultures of osteoblasts, remaining bones were further chopped into fine pieces with a scalpel. Next, the bone fragments were further washed twice PBS and incubated three times at 37°C with 1 mg/mL of collagenase type I (Sigma, Oakville, Ontario, Canada) in α -MEM without FBS for 20, 20 and 40 min. After, the bone fragments were washed twice with PBS and transferred into 100-mm culture dishes containing α -MEM supplemented with 10% FBS. Digested bone fragments were cultured until cell outgrowth and typically reached confluence within 14-21 days in culture. At confluence, cells were sub-cultured and seeded in appropriate plates for subsequent experiments.

2.5.6 Alkaline phosphatase activity

For measurement of ALP activity, cells from WT and *Cd36*KO mice were seeded in 24-well plates and cultured for 7 days. Thereafter, cells monolayers were washed three times with PBS then solubilised in ice-cold assay buffer (100 mM glycine, 1 mM MgCl₂, 0.5% Triton X-100, pH 10.5) for ALP activity determination by conversion of *para*-nitrophenylphosphate (*p*-NPP, Sigma) into *para*-nitrophenolate (*p*-NP) as described previously (Moreau *et al.*, 1997). Briefly, 75 μ L of lysate was mixed with 75 μ L of freshly prepared colorimetric substrate *p*-NPP (12.5 mM) solubilized in the assay buffer. The enzymatic reaction was conducted for 1 h at 37°C and was stopped by adding 100 μ L of NaOH 1M. Absorbance of the yellow product *p*-NP was determined spectrophotometrically at 410 nm. Protein concentration was quantified by MicroBCA protein assay (Pierce, Rockford, IL, USA) using bovine

serum albumin as standard. ALP activity was then expressed as p-NP produced in nmol/h/mg of cellular protein.

2.5.7 MTT activity

For cell expansion experiments, cells from WT and Cd36KO mice were seeded in 96well plates and cultured for 7 days in FBS-supplemented a-MEM. MTT activity was determined by microtiter tetrazolium 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrasodium bromide (MTT) reduction assays at day 1, 4 and 7 post-seeding. Briefly, at end of incubation, media were replaced with media containing 0.5 mg/mL MTT (Sigma). Two hours later media were withdrawn and formazan crystals generated by the cellular reduction activity were dissolved in dimethylsulfoxide. Absorbance was measured at 575 nm, and data are expressed as the ratio of absorbance vs values for WT cells of day 1. To corroborate MTT assay with cell culture expansion, cells in 12-well plates were trypsinized after culture period of 7 to 11 days, suspended in PBS and counted with a haemocytometer. For cell survival experiments, cells were cultured 7 days and further cultured for an additional 14-day period in differentiating medium (α -MEM containing 10% FBS and supplemented with 10 mM β -glycerophosphate (Sigma), and 50 μ g/mL ascorbic acid (Sigma)). Cell viability was determined by MTT assays as described above and expressed as the ratio of absorbance vs values for WT cells of day 0, or by the determination of cellular protein by MicroBCA assays.

2.5.8 PCR amplification

For gene expression analysis, the bone marrow MSC from WT and Cd36KO mice were seeded in 60-mm culture dishes and incubated for 7 days. Total RNA was extracted from cells using TriZol (Invitrogen) according to the manufacturer's

instructions. Reverse transcription (RT) reactions were carried out with Omniscript RT kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) using hexamers. PCR amplifications for semi-quantitative analysis were conducted with Taq PCR core kit (Qiagen) using specific primer sets for Ocn (F: 5'-CAAGTCCCACACAGCAGCTT-3', R: 5'AAAGCCGAGCTGCCAGAGTT-3'), (F: 5'-Bsp ACTCCAACTGCCCAAGAAGG-3', R: 5'-CTGTGGTTCCTTCTGCACCT-3'), Osx (F: 5'-TTCGCATCTGAAAGCCCACT-3', R: 5'-TGCGCTGATGTTTGCTCAAG-3') (F 5'and Col-Ial R ACTTCAGCTTCCTGCCTCAG-3', 5'-GCTTCTTTTCCTTGGGGGTTC-3'). Gapdh was used as a reference gene for normalization. Amplifications were carried out for 40 cycles of 1 min at 94 °C, 30 s at 58 °C and 1 min at 72 °C. Amplification products were resolved in 2% agarose gel and were visualized under UV by ethidium bromide staining. Real-time PCR analysis for mouse Runx2 (primers OT00102193) from Qiagen) was performed using the iCycler IQ detection system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and SYBR Green I (Bio-Rad) as a double-strand DNA-specific binding dye, using β -microglobuline reference (F 5'as gene TACTCAGCCACCCACCGGCCG-3', R 5'-GCTCGGCCATACTGGCATGCT-3')). Each sample was run in triplicate, and fluorescence data were collected at the end of the extension step in every cycle. To ensure specific amplification, a melting curve was calculated for each PCR reaction by increasing the temperature from 60 to 95 °C with a temperature increment rate of 0.5° C/10 seconds. Fold induction and expression levels for Runx2 were calculated using the comparative CT method [i.e., $1/(2\Delta C T)$, where ΔCT is the difference between CT target and CT reference] after normalization to β -microglobuline expression level, and data were analyzed using optical system software Version 3.1 (Bio-Rad).

2.5.9 Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM, and the significance of differences between groups has been determined using GrafPadPrism 5.0 Software by analysis of variance. Differences between groups were further evaluated by Student T test or two-way ANOVA with Bonferroni post test. Differences were considered significant at P \leq 0.05.

2.6 Results

2.6.1 Body weight, bone length and plasmatic markers

We have recently reported the expression of CD36 by osteoblasts (Brodeur et al., 2008) and herein, we took advantage of the Cd36KO mouse model to investigate the role of CD36 in bone remodeling. First, we determined general morphogenic and plasmatic parameters of Cd36KO mice. Weights of Cd36KO were significantly lower than WT mice (Fig. 2.1A), and this difference persisted from 1 to 6 months in male (between 20-25%) and female mice (10-20%). Since this lower weight may reflect a reduction of bone growth, the length of femur and tibia from Cd36KO and WT mice was compared. There were no significant differences in length of these long bones in sex- and age-matched Cd36KO and WT mice (Fig. 2.1B). Visceral and fat pad adipose tissue was globally reduced in Cd36KO mice compared to WT mice (unpublished observations) which may account for the lower weight. Since CD36 has been functionally associated with the metabolism of lipoproteins (Febbraio et al., 1999; Febbraio et al., 2000), we measured the plasma levels of total cholesterol and fractions associated with LDL and HDL. The levels of plasma total cholesterol, LDL and HDL fractions were similar in 1 month-old Cd36KO and WT mice (Table 2.1). Moreover, plasma analysis revealed a normal mineral homeostasis for calcium and phosphate, as well as normal levels of glucose and ALP activities in Cd36KO mice (Table 2.2).

2.6.2 Determination of bone architecture

We next documented whether Cd36 deficiency was associated with alterations of bone architecture. Fig. 2.2 summarizes the visual appreciations (3D reconstructions) and architectural parameters of the femoral trabecular bone of WT and Cd36KOmice. In 1 to 6 month-old mice, bone mass was visibly reduced in Cd36KO mice (Fig. 2.2A) and in accordance, the percentages of BV/TV were significantly lower at 1 month of age in male (-48%) and female (-50%) Cd36KO compared to WT mice (Fig. 2.2B). This low bone mass phenotype was also noticed in 3-6 month-old KO individuals. In absence of Cd36, Tb.Sp. was increased by an average of 27% in male and of 26% in female mice (Fig. 2.2C). Also, a significant reduction of Tb.N. was measured in both male (average of 41%) and female (average of 54%) Cd36KO mice compared to WT mice (Fig. 2.2D). However, thickness of trabeculae was not significantly different between WT and Cd36KO mice (Fig. 2.2E). Analysis of femoral cortical bone was also performed, showing a global but not significant drop in femoral cortical bone volume in Cd36KO mice indicating that Cd36 deficiency does not impact the cortical portion of femura (Fig. 2.3).

To determine whether Cd36 deficiency leads to specific alterations of long bone architecture, we also performed analysis of vertebrae. As shown in Fig. 4, the vertebral bone mass was also reduced in Cd36KO male (11-15%) and female mice (16-19%). Trabecular separation was enhanced in vertebra for both male (9.4%) and female (13.7%) Cd36KO mice (Fig. 2.4C). The number of trabeculae was significantly lower in Cd36KO mice when compared to WT (Fig. 2.4D), whereas trabecular thickness did not differ (Fig. 2.4E).

2.6.3 Plasma levels of bone remodeling markers and bone histochemistry

Since the low bone mass phenotype observed in Cd36KO mice may result from an imbalance between the processes of bone resorption and formation, the plasma levels of bone remodeling markers were determined. As shown in Fig. 2.5A, levels of bone formation markers such as OCN and PINP were reduced in plasma of 1 month-old Cd36KO mice compared to WT mice. On the other hand, levels of bone resorption markers, namely TRAP5b and CTX, were similar between Cd36KO and WT mice. We further analyzed the bone tissue sections of Cd36KO mice. As shown in Fig. 2.5B and C, lower relative ALP positive osteoblast perimeter were noticed in bone tissue of Cd36KO mice compared to WT mice whereas numbers of TRAP positive osteoclast cells of bone tissue was similar between Cd36KO and WT mice. Figure 2.5C shows representative calcein-stained interlabel distances in trabecular regions. As shown in Figure 2.5D, KO displayed reduced trabecular MAR and BFR.

2.6.4 Functions of osteoblast from Cd36KO mice

Since histochemistry analyses and plasmatic levels of bone remodeling markers suggested potential dysfunction of bone formation process in Cd36KO mice, we further evaluated the functions of MSC isolated from the bone marrow and osteoblasts from bone fragments of Cd36KO mice. First, we analyzed populations of bone marrow derived MSC from WT and Cd36KO mice by flow cytometry. At confluence, there were no differences for FSC and SSC parameters between MSC isolated from WT and Cd36KO mice (Fig. 2.6A). Phenotypic characterization of MSC was carried out using cell surface markers CD105 and CD73. Validation of these mesenchymal markers was shown using the mouse mesenchymal cell line C3H10T1/2 with positive staining for CD105 and CD73 (Fig. 2.6B). As expected, at day of isolation, MSC positive for CD105⁺ and CD73⁺ account for minor fraction (<2%) of bone marrow cells from WT and Cd36KO mice (Fig. 2.6C). Further culture

of adherent cells for 11 days resulted in similar cell populations for WT and Cd36KO as shown in Fig. 2.6A, which was positive (60-90%) for CD105 and CD73 (Fig. 2.6C). After confirming that primary cultures of MSC from WT and Cd36KO mice were similar, we investigated cell culture expansion under basal culture conditions by MTT assays and cell counts. As shown in Fig. 2.7A, MTT activity at day 1 post-seeding was similar between cells from WT and Cd36KO mice. However following 7 days of culture, the MTT activity of MSC from Cd36KO marrow was lower by 24% than WT cells (Fig. 2.7A, left panel). In accordance with the reduction of MTT activity, reduced cell numbers were evidenced at 7 and 11 days of culture, being - 22% and -32% respectively (Fig. 2.7A, right panel). Similarly, the MTT activity of osteoblasts from bone fragments of Cd36KO mice was reduced by 30% when compared to WT cells (Fig. 2.7B). Although our results indicated reduced culture expansion of cells isolated from Cd36KO mice when compared to WT mice, similar osteoblastic marker ALP activity was measured for cells from Cd36KO and WT mice after 7 days of culture (Fig. 2.7C).

The cellular lifespan of cells from Cd36KO and WT mice was investigated under culture conditions with differentiation medium for 14 days. Differentiation treatments were initiated after 7 days of culture (designated day 0 of differentiation). Reduced culture expansion of CD36 deficient cells was again evidenced by lower cellular protein content and MTT activity of 13-24% at day 0 (Fig. 2.8). After 14 days of culture, cellular protein content and MTT activity further dropped to 37-53% in Cd36-deficient MSC and osteoblasts from bone fragments (Fig. 2.8), suggesting that survival of cells lacking CD36 was impaired.

To further evaluate the mechanism leading to low bone mass phenotype in Cd36KO mice, we determined the expression levels of osteoblastic genes. As shown in Fig. 2.9A, gene expression of *Col-Ia1* in cells from Cd36KO mice was similar to cells from WT mice whereas gene expression of *Bsp* and *Ocn* was reduced. Moreover,

PCR analysis showed that expression level of the osteoblastic transcription factors *Runx2* and *Osx* was reduced in cells deficient for CD36 (Fig. 2.9B).

2.7 Discussion

The principal aim of our study was to unravel the role of CD36 in bone metabolism and osteoblast functions. We report for the first time that Cd36 ablation in mice leads to an osteopenic phenotype in trabecular bone. Low trabecular bone mass was observed in Cd36KO mice at age of 1 month and was maintained up to 6 months for both genders. Femoral cortical bone mass of Cd36KO mice tended to be lower although differences were not significant. Since changes in bone morphology are associated with imbalance between the resorption and formation processes, we determined plasma levels of bone remodeling markers. Plasma concentrations of bone formation markers, namely PINP and OCN, were diminished in 1 month-old Cd36KO mice when compared to WT mice, whereas plasma levels of bone resorption markers were not altered. In accordance, histology analysis of bone sections highlighted lower numbers of ALP positive osteoblast cells. In vitro functional characterization of bone marrow-derived MSC and bone fragment-derived osteoblasts from Cd36KO mice showed reduced cell culture expansion and survival. Moreover, gene expression of osteoblastic transcription factors Runx2 and Osx, as well as Ocn and Bsp was reduced in cells lacking CD36. Our results indicate that CD36 contributes to bone metabolism, playing a role in bone cell functions ensuring adequate bone formation.

As in comparison to WT mice, male and female Cd36KOs showed lower weight from 1 to 6 months of age, we first asked if this lower weight reflected a reduction in bone growth. As reported, femoral and tibial lengths were similar between Cd36KO and WT long bones indicating normal longitudinal bone growth of Cd36KO mice. However, following dissection we noticed that visceral and fat pad adipose tissues were globally reduced in Cd36KO mice compared to WT (unpublished observations) which may account for the reduced weight of Cd36KO mice. In accordance with our observation, lower weight and decreased total body fat in male Cd36KO mice have been previously reported (Hajri et al., 2007). To note, CD36 deficiency has been associated to impaired differentiation of adipocytes, adipocyte hypotrophy and reduction in their numbers in adipose tissue (Christiaens et al., 2012). In another study, low weight of Cd36KO mice was related to impaired CD36-mediated uptake of fatty acids to the peripheral, and particularly, to the adipose tissue (Goudriaan et al., 2003). Thus, decreased body weight in Cd36KO animals may be a consequence of disturbance in the delivery of fatty acids and/or impaired adipogenesis. Low body weight is an established risk factor for low bone mass and fracture (Faje et Klibanski, 2012). Given the involvement of CD36 in adipogenesis (Christiaens et al., 2012) and the reduced fat tissue and body weight of Cd36KO mice, such low body weight may contribute to the reduced bone mass in Cd36KO mice. To note, considering that leptin is primarily produced by white adipose tissue, and correlates positively with body fat, reduced fat tissue or lipoatrophy usually associates with low plasma levels of leptin (Haque et al., 2002). Recently, it has been proposed that peripheral leptin has bone anabolic effects and contribute to bone formation (Turner *et al.*, 2013).

Because of the role attributed to CD36 in the lipid metabolism and due to the possible association of lipid disorders and bone metabolism, we first determined the cholesterol and lipoprotein profiles of Cd36KO mice. No significant difference was noticed in plasma levels of total cholesterol or cholesterol associated with lipoproteins between Cd36KO and WT mice. Despite the large number of studies on lipid metabolism in Cd36KO mice, the literature still reports contradictory results about blood levels of lipids. Several studies have shown increased plasma levels of fasting cholesterol (Brundert *et al.*, 2011; Febbraio *et al.*, 1999), non-esterified free fatty acid (Febbraio *et al.*, 1999; Goudriaan *et al.*, 2003; Luangrath *et al.*, 2008) and

triglycerides in Cd36KO mice (Febbraio *et al.*, 1999; Goudriaan *et al.*, 2003). On the other hand, no differences for some of these parameters have also been reported in mice lacking CD36 (Brundert *et al.*, 2011; Goudriaan *et al.*, 2003; Luangrath *et al.*, 2008). Also, reduced levels of total cholesterol have been measured in male Cd36KO mice (Luangrath et al., 2008). We observed similar reduction of total cholesterol in male Cd36KO mice although this difference was not significant. Therefore, the absence of alteration in plasma cholesterol levels of Cd36KO mice observed in our study is not much surprising and such discrepancy has generally been attributed to the starving period or the method of blood collection. Secondly, we analysed general plasmatic parameters related to bone metabolism. Plasma levels of calcium, phosphate and ALP were similar between Cd36KO and WT mice which indicate that global mineral homeostasis is not altered in these mice.

To determine the role of CD36 in bone metabolism, we undertook the analysis of the bone microarchitecture of Cd36KO mice. The bone volume of femoral trabecular portion and of vertebrae was reduced in 1 to 6 month-old Cd36KO mice of both genders. Of interest, we observed a lack of increase in trabecular bone volume with age in Cd36KO mice which points out some impairment in bone formation. Similarly, global lower bone mass by 12% was reported in male Cd36KO mice by Hajri et al. (Hajri *et al.*, 2007). The lower bone mass in Cd36KO mice is explained by the diminution of trabeculae number which translates in greater trabecular separation. However no significant difference was noticed for the cortical portion of femura although tendency to reduced bone mass was observed. It is generally assumed that the mechanisms and rate of bone remodeling are different in trabecular *versus* cortical bone (Parfitt, 1984), the former showing faster responses to metabolic changes (Frost, 2001) with higher rate of bone remodeling. Therefore, the endochondral bone modeling seems globally normal in Cd36KO mice although bone remodeling at the trabecular portion may be altered. Since both gender of Cd36KO mice showed a low

bone mass phenotype, dysfunction of bone remodeling in Cd36KO mice does not appear to be related to sex steroid status.

Multiple mechanisms may be responsible for decreased bone mass. Independently of the cause of bone metabolism disruption, loss of bone tissue originates from an imbalance between the processes of bone resorption and formation which results from altered regulation/functions of bone cells. The levels of the bone formation markers PINP and OCN were reduced in Cd36KO mice whereas the levels of bone resorption markers, namely CTX and TRAP5b, were not altered. In accordance with a dysfunction of bone formation, numbers of ALP positive cells were reduced in bone tissue sections from Cd36KO mice (Fig. 2.3B) whereas similar number of osteoclasts was evidenced in WT and Cd36KO mice. Therefore, both plasma levels of bone remodeling markers and bone histomorphometric analysis point to an impaired bone formation in Cd36KO mice. Given our results which indicate similar plasma levels of bone resorption markers and number of TRAP positive osteoclasts in bone sections, cell function/differentiation of osteoclasts from Cd36KO mice was not further investigated. CD36 has been associated to cytokine-induced macrophage fusion into multinucleated giant cells (Helming et al., 2009). Despite that macrophage fusion leads also to osteoclast formation, Helming et al. (Helming et al., 2009) noticed that osteoclast formation was not altered in the absence of CD36, suggesting its selective involvement in cytokine-induced macrophage fusion for giant-cell formation. Moreover, impaired fusion of osteoclasts from Cd36KO bone marrow progenitors would lead to lower bone resorption, being inconsistent with the low bone mass revealed in Cd36KO mice.

Since our results indicate that the osteopenic phenotype in Cd36KO mice could be due to impaired osteoblast-mediated bone formation, we further investigated the functions of cells isolated from bone marrow and bone fragments of Cd36KO mice. Our data showed a decrease culture expansion potential (24-30%) of cells lacking CD36, either isolated from the bone marrow as MSC and from the bone fragments as osteoblasts. Nevertheless, bone cells from WT and Cd36KO mice showed comparable ALP activities suggesting that cell preparations from WT and Cd36KO mice were similar in terms of the cell populations, which was confirmed by phenotypic analysis. The involvement of CD36 in cell proliferation has been reported previously. CD36 deficiency has been shown to reduce the proliferation of astrocytes and delayed closure of the wound gap (Bao *et al.*, 2012). Moreover, ribozyme-mediated down regulation of CD36 was shown to inhibit growth of TSP1-expressing cells (Yamazaki *et al.*, 2004). Interestingly, our results indicate that cell survival under osteogenic culture conditions was reduced in cells deficient for CD36. Also, as cell apoptosis was not investigated, we cannot exclude that cells from Cd36KO mice are more sensitive to apoptosis. Such impaired osteoblastic bone formation caused by decreased number and activity of individual osteoblastic cells was shown to be responsible of reduction of bone mass in male patients with idiopathic osteoporosis (Ruiz-Gaspa *et al.*, 2010).

To further investigate the functions of cells lacking CD36, we determined the expression levels of key genes of osteoblast functions (Eriksen, 2010; Lian *et al.*, 2006). Our results indicated that bone marrow-derived MSC from Cd36KO mice have low gene expression of *Runx2*, *Osx*, *Ocn* and *Bsp* when compared to WT mice whereas *Col-Ia1* gene expression was similar. Such impairment in osteoblastic gene expression further suggests that bone cells functions are altered in Cd36KO mice. Given that we evidenced altered cell survival of CD36-deficient cells, reduced Von Kossa and Alizarin red stainings that was observed (data not shown) likely arise from lower density in culture dishes of cells from Cd36KO mice. Therefore, further experiments are needed to reveal mechanistic dysfunctions in CD36-deficient cells and such functional impairment are currently under investigation.

In conclusion, our results show that *Cd36*KO mice show an osteopenic phenotype which correlates with impaired bone formation and altered functions of osteoblasts. Further studies are warranted to document mechanisms that link CD36 deficiency to osteoblast dysfunctions.

2.8 Tables and Figures

Table 2.1 Plasma levels of total cholesterol, HDL cholesterol and LDL cholesterol ofWT and Cd36KO mice.

Gender	Genotype	Total cholesterol (mg/dL)	HDL cholesterol (mg/dL)	LDL cholesterol (mg/dL)
Male	WT	127.1±6.8	63.6±2.1	63.5±4.7
	КО	96.1±14.6	57.1±2.5	46.7±10.0
Female	WT	98.3±12.6	53.3±9.1	45.1±3.7
	KO	122.4±8.1	70.2±6.7	46.8±3.2

Blood was obtained from 4 weeks old WT (n=6) and Cd36KO (n=8) mice, then plasma was analyzed as outlined in the Materials and Methods section. Values are means \pm SEM.

Table 2.2 Plasma levels of glucose, calcium, phosphate and ALP activity of WT and

 *Cd36*KO mice.

Gender	Genotype	Glucose	Calcium	Phosphate (mg/dL)	ALP (U/(/min))
		(IIg/uL)	(Ing/uL)	(ing/uL)	
Male	WT	270.4±15.6	17.9±0.9	2.3±0.1	506.0±33.6
	КО	225.6±16.4	18.3±0.9	2.3±0.1	411.8±63.8
Female	WT	256.0±3.4	18.4±1.1	2.2±0.2	545.6±26.6
	КО	280.2±20.9	20.2±0.7	2.1±0.1	493.3±8.9

Blood was obtained from 4 weeks old WT (n=6) and Cd36KO (n=8) mice, then plasma was analyzed as outlined in the Materials and Methods section. Values are means \pm SEM.



Figure 2.1 : Body weight and bone length of 1 to 6 month-old WT and Cd36KO mice

A) Body weight of WT and Cd36KO male and female mice from 1 to 6 months of age. Data are expressed as mean \pm SEM from 10-37 mice per group of age. Bonferroni post-test: ***P<0.001 compared to WT male; ${}^{\pounds}P<0.05$, ${}^{\pounds}P<0.01$, ${}^{\pounds\pounds}P<0.001$ compared to WT female. B) Femur and tibia lengths for WT and Cd36KO mice of 1-3 months old. Data are expressed as mean \pm SEM from 11-35 mice per group of age.



Figure 2.2 : Microarchitecture analysis of trabecular femoral bone of WT and Cd36KO mice

A) Representative 3D reconstructions of femoral trabecular bone from female WT and *Cd36*KO mice. B) Percent bone volume (BV/TV) of femoral trabecular portion of 1 to 6 month old male and female WT and *Cd36*KO mice. C) Trabecular spacing (Tb.Sp), D) Trabeculae number (Tb.N) and E) trabecular thickness (Tb.Th) of femurs from 1 to 6 months old male and female WT and *Cd36*KO. Values are means \pm SEM from 17-22 mice per group of age. Bonferroni post-test: *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001 compared to WT male; [£]P<0.05 compared to WT female.



Figure 2.3 : Microarchitecture analysis of cortical femoral bone of WT and Cd36KO mice

A) Representative 3D microCT images of cortical bone in the femurs of 1 to 6 month female mice. B) Bone volume (BV), C) cortical thickness (Cort.Th), D) periosteal perimeter (Ps.Pm) and endocortical perimeter (Ec.Pm) of cortical portion from femurs of 1 month male and female WT and Cd36KO mice. Values are means \pm SEM from 6-14 mice per group of age.





A) Representative 3D reconstructions of vertebrae of 1 and 4 month-old female mice. B) Percent bone volume (BV/TV), C) trabecular spacing (Tb.Sp.), D) trabeculae number (Tb.N.) and E) trabecular thickness (Tb.Th.) of vertebral from male and female WT and Cd36KO mice. Values are means \pm SEM from 5-18 mice per group of age. Bonferroni post-test: *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001 compared to WT male; [£]P<0.05 and ^{££}P<0.01 compared to WT female.



Figure 2.5 : Plasma markers of bone remodeling and bone histochemical analysis of long bones from WT and Cd36KO mice

A) Plasma levels of OCN, PINP, TRAP5b and CTX from 1 month-old male WT and Cd36KO mice. Values are mean±SEM from 3-9 mice. **P<0.01 compared to WT. B-D) Raw scans, ALP, TRAP and calcein stainings on representative bone sections from 1 month-old Cd36KO and WT mice. Bone sections were used to evaluate relative osteoblast perimeter (Ob.Pm), number of osteoclasts (#Oc/mm) as well as mineral apposition rate (MAR) and bone formation rate (BFR). Values are means±SEM from 3 mice in each group. *P<0.05, **P<0.01 compared to WT.

A


Figure 2.6 : Phenotypic profile of bone marrow-derived MSC from WT and Cd36KO mice

Flow cytometry analysis of MSC isolated from bone marrow of WT and Cd36KO mice was performed on cells freshly isolated and adherent cells after 11 days of culture using CD105-PE and CD73-PerCP antibodies. A) Forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) of the MSC population from bone marrow of WT and Cd36KO mice at day 11 of culture. B) CD105-PE and CD73-FITC staining of the mesenchymal cell line C3H10T1/2. C) CD105-PE and CD73-FITC fluorescence for freshly isolated bone marrow cells (grey) and adherent cells after 11 days of culture (clear) from WT and Cd36KO mice.



Figure 2.7 : Cell culture expansion and ALP activity of CD36-deficient bone cells

MTT assay or cell counts was performed at day 1, 7 and 11 days post seeding in basal media for A) MSC from bone marrow cells (BM) and B) osteoblasts (OB) from bone fragments of WT and Cd36KO mice. C) ALP activity was measured on MSC and OB after 7 days of culture. Data represent mean \pm SEM of 5-9 independent experiments. Bonferroni post-test: **P<0.01, ***P<0.001.



Figure 2.8 : Cell survival of CD36-deficient osteoblasts

MTT assays and protein measurements were performed on osteoblasts isolated from bone marrow A) and long bone B) of WT and Cd36KO mice after 0 and 14 of culture in differentiation medium. Data represent mean \pm SD of two independent experiments performed in triplicates.



Figure 2.9 : Expression of osteoblastic genes by cells from WT and Cd36KO mice

Total RNA was isolated from MSC and cultured for 7 days. The levels of transcripts were determined by semi-quantitative RT-PCR using specific primers for A) *Col-Ia1*, *Bsp* and *Ocn* or B) osteoblastic transcription factors *Runx2* and *Osx* as described in Material and methods. Expression levels were normalized against expression of reference gene. Data are mean \pm SEM of 3-8 independent cell preparations. Student t test: *P<0.05, **P<0.01.

CHAPITRE III

SYSTEMIC AND CELLULAR ALTERATIONS IN CD36-DEFICIENT MICE REDUCE SURVIVAL AND OSTEOGENIC POTENTIAL OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS

Olha Kevorkova, Corine Martineau, Pierre-Paul Gallant, Louise Brissette and Robert Moreau

Article a été soumis à la revue Bone, le 1 septembre 2015, numéro de soumission

BONE-D-15-00838

3.1 Avant-propos

Afin de continuer l'étude du métabolisme osseux chez les souris Cd36KO, nous avons procédé à l'évaluation de facteurs systémiques tels que la leptine et l'adiponectine, ainsi que locaux tels que les facteurs de transcription et la voie de signalisation Wnt impliquée dans l'ostéogenèse. On a aussi comparé certaines réponses cellulaires *in vitro* (apoptose, nécrose, cycle cellulaire, réponse aux traitements avec la TSP-1 et l'hexaréline) de CSM dérivées de souris Cd36KO et WT.

Nous avons démontré que l'ablation de CD36 mène à une diminution du niveau plasmique et de l'expression génique de la leptine, à une augmentation de l'apoptose des CSM et à l'altération de la voie Wnt canonique.

J'ai été impliquée dans toutes les facettes de ces travaux. Dre Corine Martineau a participé à l'élaboration des figures et à la rédaction du manuscrit. Pierre-Paul Galant et moi-même avons réalisé les expériences de traitements des cellules MC3T3-E1 à la TSP-1 et à l'hexaréline. Avec la participation du Dre Louise Brissette et du Dr Robert Moreau j'ai élaboré les figures, analysé les résultats et rédigé le manuscrit.

3.2 Résumé

Le récepteur CD36 est exprimé par les ostéoblastes responsables de la formation osseuse, mais sa contribution au métabolisme osseux est encore mal élucidée. Récemment nous avons rapporté que les souris Cd36KO ont une faible masse osseuse résultante d'une formation osseuse réduite. Ici, nous caractérisons davantage les facteurs systémiques et cellulaires impliqués dans le métabolisme osseux et le comportement *in vitro* de CSM provenant de souris Cd36KO. Ces souris souffrent de lipodystrophie associée à un faible taux plasmatique de leptine et à une réduction de rapport leptine/adiponectine. L'expression de la Lep par les CSM Cd36KO a été réduite de 60% par rapport au CSM provenant de souris WT. Une diminution de prolifération, une réduction de survie cellulaire et une augmentation du niveau d'apoptose ont été détectées dans les CSM Cd36KO au jour 21 de culture cellulaire. Les CSM provenant de souris Cd36KO surexpriment le Ppary impliqué dans la croissance cellulaire, la régulation de l'apoptose et du cycle cellulaire. En plus, l'expression génique de Gli-I et de Forkhead-O1 (Foxol) était également augmentée dans les CSM Cd36KO. L'expression génique d'un facteur de transcription chondrogénique Sox9 était augmentée alors que celle d'un marqueur des chondrocytes matures Col-IIa n'a pas été modifiée dans les CSM Cd36KO, ce qui a été confirmée par l'absence de différence dans la morphologie de la plaque de croissance entre les deux génotypes. L'étude de la voie de signalisation Wnt a révélé une réponse normale dans les CSM WT et Cd36KO comme en témoigne la régulation en hausse similaire par Wnt3a de ses gènes cibles Axin2 et Lef1. Toutefois, l'expression de Wnt3a et de Wnt5a a respectivement été réduite de 40% et 50% dans les CSM Cd36KO. Il n'y avait pas de différence dans l'expression de Lrp5/6 et de *Rspo2*. Par contre, l'expression de *Sost* et de *Dkk1*, deux antagonistes de la voie Wnt a été respectivement augmentée de 1,8 et 3,4 fois dans les CSM Cd36KO. Nos résultats suggèrent qu'une faible masse osseuse des souris Cd36KO peut être

expliquée, au moins en partie, par une diminution de la concentration sanguine en leptine et des perturbations dans la voie de signalisation Wnt dans les CSM.

3.3 Abstract

CD36 is expressed by bone-forming osteoblasts but its contribution to bone metabolism is still poorly documented. We have recently reported that Cd36-null mice show low bone mass associated with reduced bone formation. Here, we further characterize the systemic and local factors involved in bone metabolism and the in vitro cellular behavior of mesenchymal stromal cells (MSCs) lacking Cd36. Cd36null mice show lipodystrophy associated with low plasma levels of leptin (lep) and a reduced leptin/adiponectin ratio. Lep gene expression by Cd36-null MSCs was reduced by 60% compared to wild type (WT) MSCs. Lower proliferation rate, reduced cell survival and increased apoptosis level were evidence in Cd36-null MSCs cultured for 21 days. Cd36-null MSCs also show over expression of Ppary involved in cell growth, regulation of apoptosis and cell cycle. Moreover, genetic expression of Gli-I and forkhead-01 (Foxo1) was also increased in Cd36-null MSCs. Gene expression of the chondrogenic transcription factor Sox9 was increased and marker of mature chondrocyte Col-IIa was unchanged in Cd36-null MSCs, in accordance with the absence of differences in growth plate morphology between both genotypes. The study of Wnt signaling pathway reveals normal response in WT and Cd36-null MSCs, as evidenced by similar Wnt3a-induced upregulation of the target gene Axin2. However, gene expression of Wnt3a by Cd36-null MSCs was reduced by 40% and Wnt5a by 50% when compared to WT cells. There was no difference in gene expression of Lrp5/6 and Rsp02. Moreover, gene expression of Sost and Dkk1, two antagonists of the Wnt pathway were increased by 1.8 and 3.4-fold, respectively. Our results suggest that the low bone mass phenotype of Cd36-null mice may be

explained, at least in part, by diminution of blood leptin level and alterations of Wnt signaling pathway in MSCs.

3.4 Introduction

Bone tissue development and maintenance require balance between bone cell proliferation, survival, and differentiation, which are modulated by a network of signaling pathways and transcription factors. The osteoblasts are specialized mononuclear cells responsible for the deposition and mineralisation of bone matrix. These bone-forming cells derive from the bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) (Fakhry *et al.*, 2013) which are also precursors for chondrocytes and adipocytes. The commitment and differentiation of MSC towards specialized cells depend on a variety of signaling pathways and transcription factors.

Several major signaling pathways, such a Wnt, BMP, FGF and hedgehog (HH), play an important role in regulating osteogenic differentiation from MSCs (Gordon et Nusse 2006; Luu *et al.*, 2007; James *et al.*, 2010). Wnt signaling represses MSCs commitment to the chondrogenic and adipogenic lineages and enhances commitment to, and differentiation along, the osteoblastic lineage (Hill *et al.*, 2005; Kennell et MacDougald, 2005; Miclea *et al.*, 2009). The Wnt family is represented by 20 secreted glycoproteins with post-translational lipid modifications (palmitoylation), involved in signaling cascades (classified as canonical and non-canonical) essential for embryonic development and tissue regeneration (Logan et Nusse, 2004). Wnt proteins function through a complex of FZD and LRP5/6, which activate two signaling pathways: the β -catenin-dependent canonical or β -catenin-independent noncanonical pathway (Gordon et Nusse, 2006). Following Wnt binding, the intracellular tail of LRP5/6 binds Axin1 or Axin2 and causes dissociation of β -catenin from its protein complex and activation of β -catenin signaling (Mao *et al.*, 2001). β -catenin translocates to the nucleus, associates with the TCF/Lef and regulates the expression of Wnt target-genes (Travis *et al.*, 1991). *Via* this mechanism, Wnt/ β -catenin signaling promotes the progression of cells to bone-producing osteoblasts. Also, RSPO act as secreted Wnt agonists that potentiate Wnt signaling through binding to leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor which then acts as coreceptors with FZD and LRP5/6 (Kazanskaya *et al.*, 2004). On the other hand, the Wnt pathway is also submitted to negative regulation as it is antagonized by extracellular factors such as SOST (encoded by the *Sost* gene) and DKK1 (Kawano et Kypta, 2003; Li *et al.*, 2005).

We have recently reported that cluster of differentiation 36 deficient (Cd36-null) mice show low bone mass in femur and vertebrae from 2 to 6 month-old mice (Kevorkova et al., 2013). CD36 is a cell-surface membrane glycoprotein of the class B scavenger receptor family expressed by a variety of tissues and cells, and binds various extracellular ligands such as oxidized low-density lipoprotein, thrombospondin-1 (TSP-1), growth hormone releasing peptides, hexarelin, fibrillar A_β amyloid peptides and long-chain fatty acids (LCFA) (Park 2014). CD36 is involved in energy metabolism, atherosclerosis, angiogenesis, immunity and behaviour (Febbraio et al., 2001; Silverstein et Febbraio 2009). The inhibition of angiogenesis is one of the most well-established functions of CD36. Following binding of TSP-1, CD36 expressed by microvascular endothelial cells initiates anti-angiogenic signals that lead to inhibition of adhesion, migration and proliferation of endothelial cells, and induction of their apoptosis (Dawson et al., 1997). As a LCFA translocase, CD36 regulates the fatty acid uptake in adipose tissue, and growth and proliferation of adipocytes (Coburn et al., 2000; Vroegrijk et al., 2013). Adipose cells are recognized to secrete the hormone leptin (Park et Ahima, 2014) that exerts a dual effect on bone homeostasis. Through central hypothalamic adrenergic β^2 signaling, leptin negatively regulates bone by increasing the production of RANKL that activates the proliferation of osteoclasts and bone resorption (Takeda et al., 2002). Peripheral leptin increases bone mass via

direct action on osteoblasts by stimulating their proliferation and differentiation (Gordeladze *et al.*, 2002; Holloway *et al.*, 2002; Martineau *et al.*, 2014).

CD36 is expressed by osteoblasts (Brodeur *et al.*, 2008), but its contribution to bone metabolism is still poorly documented. In accordance with the low bone mass of Cd36-null mice, we measured reduced plasma levels of bone formation markers, and histology analysis highlighted lower osteoblast perimeter and reduced bone formation rate (Kevorkova *et al.*, 2013), suggesting that osteoblastic functions were impaired in the absence of CD36. Although the consequence of CD36 deletion for bone status is documented, the exact mechanisms remain to be determined. The current study aimed at further investigating the impact of CD36 deficiency on bone metabolism and MSCs function.

3.5 Materials and methods

3.5.1 Animals

Cd36-null mice on a C57BL6 background were obtained from Dr Maria Febbraio (Cleveland, Ohio) and were cross-bred at least 7 times to wild-type (WT) C57BL/6J mice purchased from Charles River (Boston, MA, USA). All animals were kept under a 12 h light: 12 h darkness cycle at 25°C, with free access to food and water according to protocols approved by the Animal Care and Use Committee of Université du Québec à Montréal (#747). *Cd36* genotyping was done by PCR as described previously (Luangrath *et al.*, 2008) using specific primers for the targeted allele (5'-CAGCTCATACATTGCTGTTTATGCATG and 3'-CGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATC). One to 9 month-old mice were used throughout the study.

3.5.2 Plasma analysis

Blood was collected into 3 ml heparin collection tubes (68 USP, BD Bioscience, Mississauga, ON, Canada) by cardiac puncture of anaesthetised mice, prior to their euthanasia. Plasma was obtained by centrifugation for 30 min at 2000 g and 4°C and stored at -80°C until analysis. Plasma leptin and adiponectin levels were respectively measured by Mouse/Rat Leptin Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Burlington, Ontario, Canada) and Adiponectin Mouse ELISA Kit (Abcam, Cambridge, UK), according to manufacturer's recommendations.

3.5.3 Primary cultures and cell lines

For primary cultures of bone marrow MSCs, 4-8 week-old animals were euthanatized and femora and tibiae from WT and *Cd36*-null mice were collected and carefully cleaned from adherent soft tissues. Bones were broken in half and centrifuged 5 min at 2500 rpm for the collection of bone marrow cells. Cell pellets were re-suspended in α -MEM with phenol (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) supplemented with 20% foetal bovine serum (FBS) (NorthBio, Toronto, Ontario, Canada), L-glutamine (Invitrogen), penicillin/streptomycin (Invitrogen) and 0.1% fungizone (Invitrogen), seeded in 100 or 60-mm dishes (Sarstedt, Montreal, Quebec, Canada). Dependent on assay the MSCs from one mouse were seeded in 100-mm dishes or 150,000 cell/cm² were seeded in 60-mm dishes. The cells were allowed to adhere for 5 days. Nonadherent cells were discarded and adherent cells were washed twice with PBS and cultured in α -MEM supplemented with 20% FBS. MC3T3-E1 mouse preosteoblasts, subclone 4, were obtained from ATCC and maintained in α -MEM supplemented with 10% FBS, L-glutamine and penicillin/streptomycin. Cells were subcultured weekly and plated at the indicated densities according to assay.

3.5.4 Apoptosis and cell cycle assay

Adherent MSCs were cultured in 60-mm dishes in α -MEM supplemented with 20% FBS until used for analysis. Cells were lifted by incubation in 0.05% trypsin-0.02% EDTA solution (Invitrogen), suspended in PBS, counted with a haemocytometer. The cell suspensions were washed in PBS and used for apoptosis assay with Annexin V:FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, Mississauga, Ontario, Canada) according to the manufacturer's instructions or for cell cycle assay by incubation with staining buffer containing RNase 0.2 mg/mL (Roche Diagnostics, Laval, Quebec, Canada) and propidium iodide 25 μ g/mL (BD Biosciences) in PBS for 45 min at 37°C. After incubation, fluorescence was measured for 10,000 events per sample by flow cytometry (BD AccuriC6, BD Biosciences) and analysis was performed using BD AccuriC6 software (BD Biosciences) at day 7, 14, 21 of culture.

3.5.5 Proliferation assays

For proliferation assays, MC3T3-E1 cells were plated in 96-well plates (Sarstedt) at 2,500 cells/cm² and were cultured in α-MEM medium containing 10% FBS for 96 h. The adherent MSCs were left in 100-mm dishes to reach confluence, washed twice with PBS, and then harvested for experimentation. The MSCs were seeded at 20 000 cells/cm² in 96-well plates and were cultured in α-MEM medium containing 20% FBS for 96 h. For both cells types, medium was replaced for medium containing 2% FBS without or with 400, 500 and 600 ng/mL TSP-1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) or 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹ M hexarelin (Abcam, Toronto, Ontario, Canada) for another 96h. Viability was evaluated before treatment (day 0) as well 96 h after with tetrazolium microtiter assay (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada). Briefly, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reagent was added to the medium at a final concentration of 0.5 mg/mL. Two hours later, formazan crystals generated by cellular reduction of the MTT reagent were dissolved

in dimethyl sulfoxide for 30 min at 37°C and the absorbance was determined at 570 nm with a microplate reader (Tecan, Männedorf, Austria). Cell proliferation was expressed as percent of absorbance vs values of day 0.

3.5.6 PCR

For gene expression analysis, bone marrow MSCs from WT and Cd36-null mice were seeded in 60-mm culture dishes and incubated for 7 days. For Wnt3a stimulation assays, the MSCs from WT and Cd36-null mice were cultured in α -MEM medium containing 20% FBS for an additional 24 h without or with 100 ng/mL Wnt3a (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada). Total RNA was extracted from cells using TriZol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription (RT) reactions were carried out with Omniscript RT kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) using hexamers as random primers. PCR amplifications for the genes of interest were conducted using specific primer sets (Tab. 3.1). Real-time PCR analysis was performed using the iCycler IQ detection system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and SYBR Green I (Takara, Mountain View, CA, USA) as a double-strand DNA-specific binding dye, using β -microglobuline as reference gene. Each sample was run in triplicate, and fluorescence data were collected at the end of the extension step in every cycle. To ensure specific amplification, a melting curve was calculated for each PCR reaction by increasing the temperature from 60 to 95° C with a temperature increment rate of 0.5° C/10 seconds. Fold induction and expression levels for all gene were calculated using the comparative CT method [i.e., $1/(2\Delta CT)$, where ΔCT is the difference between CT target and CT reference] after normalization to β -microglobuline expression level, and data were analyzed using optical system software Version 3.1 (Bio-Rad).

3.5.7 Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical differences between groups were further evaluated by Student T-test or two-way ANOVA with Bonferroni post test using GraphPad Prism 5.0 Software. Differences were considered significant at P \leq 0.05.

3.6 Results

3.6.1 Leptinemia and endochondral ossification

Since our previous results demonstrated lower body weight and a global reduction of visceral adipose tissue (Kevorkova *et al.*, 2013) - the primary source of leptin (Park et Ahima, 2014), - we measured basal unfasted leptinemia in mice of both genotypes. As shown in Fig. 3.1A, plasma leptin was constantly lower in Cd36-null mice compared to corresponding WT mice aged up to 6 months. Adiponectin levels were unaffected, therefore causing a significant decrease in the leptin-to-adiponectin ratio (Fig. 3.1B, C). Leptin levels were positively correlated with total weight in WT mice; this correlation was very weak in younger Cd36-null mice, but stronger at 6 months of age (Fig. 3.1D, E).

Interestingly, we measured a 2-fold decrease in Lep gene expression in bone marrow derived MSCs from the null mice compared with their WT counterparts (Fig. 3.2A). Leptin has been postulated to be a modulator of endochondral ossification (Kume et al., 2002), which led us to further investigate skeletal development in null mice. It was found that the expression of the chondrogenic transcription factor Sox9 was increased in Cd36-null MSCs (Fig 3.2B); however, the expression of the chondrocyte marker Col-IIa by null cells was similar to cells from WT mice (Fig. 3.2C). As

shown in Fig. 3.2E, growth plate morphology and thickness was comparable between Cd36-null and WT mice; moreover, our previous results report similar femur and tibia length in Cd36-null and WT mice at 1-3 months of age (Kevorkova *et al.*, 2013).

3.6.2 Cell proliferation and survival

Since our previous results indicated reduced bone formation rate and impaired functions of Cd36-null MSCs (Kevorkova et al., 2013), we further characterized the in vitro behavior of MSCs lacking Cd36. There was no difference in number of total bone marrow MSCs per mouse at seeding (Fig. 3.3A). As shown in Fig. 3B, at day 7 post seeding the rates of proliferation and apoptosis of Cd36-null and WT MSCs were similar; however at day 14 and 21 Cd36-null MSCs showed reduced cell number, accompanied by a higher percentage of apoptotic cells relatively to WT cells. Indeed, apoptosis of adherent cells was increased almost 3-fold in Cd36-null MSCs when compared to WT MSCs at day 14 $(5.3\% \pm 1.3\% vs \ 1.6\% \pm 0.4\%)$ and over 3-fold at day 21 (7.2%±1.0% vs 2.9%±0.5%). Moreover, the level of apoptotic and necrotic cells in supernatant was nearly 3 times greater at day 21 post seeding in null MSCs $(27.3\% \pm 0.5\%)$ compared to WT cells $(11.5\% \pm 2.3\%)$ (Fig. 3.3C). Gene expression of cyclin (Ccn) A2 and D1 was significantly higher in Cd36-null MSCs under basal conditions, suggesting deregulation of cell cycle (Fig. 3.3D). However, the proportion of cells in the different stages of cell cycle was however comparable between both genotypes (Tab. 3.2). We therefore explored how the null cells behaved in the presence of known CD36 ligands.

3.6.3 Effects of CD36 ligands

Given that TSP-1 and hexarelin are two major ligands for CD36 (Park, 2014), we investigated their effect on cell behavior *in vitro*. In order to verify the effect of these

ligands on osteoblastic cells, we evaluated cell survival in the MC3T3-E1 cell line following a 96 h incubation with increasing amounts of each agent. As shown in Figure 3.4A and B, both hexarelin (from 10^{-9} to 10^{-7} M) and TSP-1 (at 500 and 600 ng/mL) increased MC3T3-E1 cell proliferation by about 50% compared to untreated control. After treatment with TSP-1 at 600 ng/mL and hexarelin at 10^{-9} M, a marked enhancement of proliferation was observed in WT but not in *Cd36*-null MSCs (Fig. 3.4C, D). Since both ligands are known to induce the expression and/or activity of the PPAR γ transcription factor through binding to CD36 (Demers *et al.*, 2008), we investigated whether the expression of this factor was affected in the null cells.

It was found that *Ppary* is overexpressed in *Cd36*-null MSCs (Fig. 3.5A); moreover, *Gli-I*, a member of SHH signaling pathway implicated in angiogenic differentiation of bone marrow derived cells (Renault *et al.*, 2010) was also upregulated in *Cd36*-null MSCs (Fig. 3.5B). Another possible important transcription factor in the regulation of cell cycle is forkhead-O1 (FOXO1) which is implicated in a wide range of cellular and developmental processes (van der Vos et Coffer, 2008). *Foxo1* was over-expressed by 2.5 fold in *Cd36*-null MSCs compared to WT cells counterpart (Fig. 3.5C). Interestingly, both GLI-I and FOXO1 have been reported to interact with the Wnt signaling pathway (Iyer *et al.*, 2013; Nakamura *et al.*, 2013); considering the importance of Wnt signaling in bone metabolism, we explored whether this pathway was affected by CD36 deficiency.

3.6.4 Wnt signaling pathway

Since Wnt signaling has been identified as a major pathway in MSCs commitment and differentiation into the osteoblastic lineage (Gordon et Nusse, 2006), we analysed this pathway in WT and Cd36-null MSCs. As shown in Fig. 3.6A, gene expression of Wnt receptor *Lrp5/6* and Wnt secreted ligand *Rspo-2*, was comparable in both genotypes. However, gene expression of Wnt3a and Wnt5 ligands in Cd36-null MSCs were reduced by 40% and 50%, respectively, compared to WT cells (Fig. 3.6B). Moreover, gene expression of *Sost* and *Dkk1*, two antagonists of the Wnt pathway, were increased by 1.8 and 3.4-fold, respectively (Fig. 3.6C). Basal expression level of *Axin2* was identical in WT and *Cd36*-null MSCs, but gene expression of *Lef1* in unstimulated cells was lower in CD36 deficient cultures (Fig. 3.7A, B). Because Wnt3a is classically used to induce Wnt target-genes, we tested whether lack of *Cd36* impaired the Wnt canonical pathway; Wnt3a treatment generated a similar genetic upregulation of transcriptional gene target *Axin2* in WT and *Cd36*-null MSCs (Fig. 3.7B).

3.7 Discussion

We recently reported impaired bone formation in the long bone and vertebrae of Cd36-null mice (Kevorkova *et al.*, 2013); the present study further investigated the role of CD36 in the physiology of bone marrow-derived MSCs. Our results indicate that, concomitantly to low leptinemia, CD36 deficiency causes a drastic increase in number of apoptotic and necrotic MSCs, as well as significant loss of viability *in vitro*. Moreover, the expression of *Ppary*, a target-gene of CD36, as well as that of Wnt signaling ligands was affected by CD36 deficiency.

Numerous systemic and local factors influence bone homeostasis, such as the peptidic hormone leptin known to regulate bone mass *via* central and peripheral mechanisms. *In vitro*, leptin stimulates osteoblast proliferation and differentiation while inhibiting osteoclastogenesis. *In vivo*, peripheral leptin administration increases bone mass and reduces bone fragility (Cornish *et al.*, 2002; Turner *et al.*, 2013), and increases periosteal bone formation and commitment of MSCs towards osteoblasts (Thomas *et al.*, 1999). Circulating leptin is mainly secreted by adipose tissue (Zhang *et al.*, 1994)

and Cd36 deficient mice have lower body mass (Kevorkova *et al.*, 2013) and decreased adipogenesis (Vroegrijk *et al.*, 2013). Our results indicate decreased plasma leptin levels without any changes in adiponectin levels in Cd36-null mice. Moreover, the body mass-to-leptinemia correlation, usually positive (Monti *et al.*, 2006), is severely stunted in the three month-old null mice. There are discrepancies concerning leptin levels in the Cd36-null mouse model, which has been reported to be either hypo- (Ibrahimi, 2003) or hyperleptinemic (Hajri *et al.*, 2007). These differences could be linked to diet type and various level of physical activity; however, genetic context has likely the most impact, as each strain shows different basal metabolism levels (Šedová *et al.*, 2012). Either condition however points towards disrupted energetic balance mainly linked to the fatty acid uptake functions of CD36 (Hajri *et al.*, 2007).

As it was previously shown, Cd36-null MSCs have reduced osteogenic potential (Kevorkova et al., 2013). Since leptin is known to couple energy and bone homeostasis (Karsenty, 2006; Yadav et Karsenty, 2009), namely during the endochondral ossification process (Kume et al., 2002; Kishida et al., 2005), we investigated whether leptin and chondrogenic markers expression in marrow cells was altered by CD36 deficiency. Our results indicate decreased leptin expression yet an increase of chondrogenic transcription factor Sox9 in MSCs derived from Cd36null mice. However, the expression of Col-IIa, a marker of mature chondrocyte, and growth plate morphology did not indicate any other alteration. Interestingly, previous data showed decreased Osx and Runx2 gene expression by Cd36-null MSCs (Kevorkova et al., 2013). The expression of both markers in osteoblasts is influenced by exposure to leptin (Zhou et al., 2012) or by circulating leptin levels (Kalra et al., 2009). Combined with the present data, these alterations can indicate a delayed transition from osteochondroprogenitor to osteoblast manifested by increased chondrocyte recruitment and an increase in cartilage growth plate. Growth plate thickness was comparable for Cd36-null and WT mice. The hypertrophic zone was

slightly larger in null mice, but was not statistically significant (data not shown). This mild alteration could involve CD36-dependent secretion of TNF α (Cai *et al.*, 2012). Indeed, the TNF- α receptor 1 has been associated to new endochondral bone formation in adult mice (Lukic *et al.*, 2005). Moreover, TNF- α is known to induce leptin expression and secretion (Finck et Johnson, 2000); endochondral ossification of the *Cd36*-null mouse could therefore be delayed by lower leptin level.

Our data also show lower proliferative potential of Cd36-null MSCs, as reported previously in several other tissues (Ferracini et al., 2013; Vroegrijk et al., 2013; Woo et al., 2012; Won et al., 2008). Deletion of CD36 exacerbates injury after acute focal stroke in neonatal mice (Woo et al., 2012) and diminishes removal of apoptotic cells by macrophages (Ferracini et al., 2013). Cd36-null macrophages also show a decreased antigen-specific plasma cell generation with lower number of phosphoryl choline specific plasma cells (Won et al., 2008). CD36 deficiency promotes decreased adipocyte size in fat pads and impaired adipocyte recruitment from precursor pools (Vroegrijk et al., 2013). The exact mechanisms by which CD36 regulates cell activity are still not fully elucidated. Cell cycle progression is crucial for both proliferation and differentiation; however, our results indicate that CD36 deficiency does not alter the percentage of MSCs in each cell cycle phase. The cell cycle is a multi-stage process, regulated by a variety of factors, such Ccn, Ccndependent kinases and Ccn-dependent kinase inhibitors. The CcnD is essential for entry in G1 phase (Sherr, 1994), as CcnE and CcnA regulate progression from G1 into S phase (Ohtsubo et al., 1995). Some studies also revealed a relationship between the level of CcnA expression and apoptosis (Adachi et al., 2001; Rivera et al., 2006; Wang et al., 2009; Zuryn et al., 2007). Pro-apoptotic role of CcnA2 was shown in human erythroleukemic cell line (Wang et al., 2009). Our results indicate increased level of apoptosis in the adherent cells and greater number of necrotic cells in the supernatant accompanied by augmented gene expression of CcnA2 and CcnD1 in Cd36-null MSCs. Along with the impaired proliferation, these data agree with the

aforementioned studies stating the cells and tissue dysfunctions induced by lack of CD36 (Eto et al., 2003; Vroegrijk et al., 2013; Won et al., 2008).

As Cd36-null cells show impaired basal proliferation and higher apoptosis, we investigated their response to known CD36-specific ligands. Hexarelin is a synthetic peptide of the growth hormone-releasing peptides family known to exert cardiovascular effects through CD36 binding (Bodart *et al.*, 2002). TSP-1 is an antiangiogenic factor reported to inhibit tube formation by bone marrow-derived angiogenic cells *in vitro via* a CD36-dependent mechanism (Wang *et al.*, 2013).Our data show that exposure to hexarelin or TSP-1 enhances MC3T3-E1 preosteoblast and WT but not Cd36-null MSCs proliferation. We can hypothesize that CD36 is not only implicated in balance between proliferation and apoptosis under basal conditions, but also in ligand-induced proliferative responses of bone marrow derived MSCs. To conclusively support a specific role for CD36 in cell proliferation, the response of Cd36-null MSCs to other growth factors independent of CD36 such as FGF or PDGF could be investigated.

A common downstream factor involved in hexarelin and TSP-1 binding to CD36 is PPAR γ (Demers *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2014); we therefore verified whether its basal expression was altered by *Cd36* deficiency. Since the transcription factor PPAR γ regulates commitment of MSCs towards adipogenesis (Fakhry *et al.*, 2013), over-expression of *Ppary* in *Cd36*-null MSCs should lead to increased adiposity, which is not the case given that fat reserve is reduced in the *Cd36*-null mice. PPAR γ is also known to be involved in cell growth and its activation promotes apoptosis and cell cycle arrest (Elrod et Sun, 2008). Thus, increased cells apoptosis and lower proliferation leading to low bone mass and decreased adipogenesis may be related to over expression of *Ppary* in *Cd36*-null MSCs. We also observed increased expression of transcriptional factor *Gli-I* in *Cd36*-null MSCs. GLI-I induces the expression of downstream target molecules in the SHH pathway that govern embryonic vascular development and regulate injury-induced angiogenesis in adult tissue (Renault *et al.*, 2010). It was recently reported that SHH signaling proteins, including Gli-I, are upregulated in *Cd36*-null bone marrow angiogenic cells suggesting implication of this pathway in CD36's regulation of angiogenesis (Wang *et al.*, 2013). Our previous study demonstrates *Runx2* downregulation in *Cd36*-null mice (Kevorkova *et al.*, 2013). Interestingly, *Cbfa1/Runx2* deficient mice show reduced bone angiogenesis, diminished blood vessel invasion and lack of VEGF and VEGF receptor expression in hypertrophic chondrocytes (Zelzer *et al.*, 2001). Moreover, inadequate bone vascularity is associated with decreased bone formation and bone mass (Portal-Nunez *et al.*, 2012). Additional studies are required to evaluate the angiogenesis status in *Cd36*-null bone.

Our data show upregulation of *Foxol* in *Cd36*-null MSCs. This finding agrees with reports that *Foxo1* overexpression in MC3T3-E1 cells reduces proliferation (Siqueira et al., 2011). Moreover, FOXO1 was found to contribute to apoptosis. In numerous cell types, activation of the FOXO family leads to apoptosis, particularly when its expression or activation is prolonged. FOXO1 induces the expression of a large number of proapoptotic mediators such as $TNF-\alpha$, FAS ligand, TRAIL and caspases (Alikami et al., 2005; Giley et al., 2003). Diabetic mice show increased chondrocyte apoptosis through enhanced production of TNF- α and FOXO1 activation (Kayal et al., 2010). Increased number of apoptotic cells leads to secondary necrosis, which in turn releases cytotoxic factors that alter cell behavior and functions (Elliott et Ravichandran, 2010). Thus, we cannot exclude increased cytotoxin accumulation in prolonged culture of Cd36-null MSCs which results in formation of apoptotic and necrotic cells. In addition, CD36 is implicated in cell adhesion (Oquendo et al., 1989), consequently the increased necrotic cell number may be related to impaired MSCs adherence. Some studies state a vital relationship between FOXOs and Ccns; these factors are believed to stabilize the G1 and G2/M cell cycle checkpoints by inhibiting CcnD and CcnA (for a review, see (Ho et al., 2008)). As a result, apoptosis

and proliferation of Cd36-null MSCs may be altered due to up-regulation of CcnA2and D1, coupled to PPAR γ -induced overexpression of Foxo1. In addition, constitutively active FOXO1 inhibits the differentiation of pre-adipocytes into mature adipocytes (Nakae *et al.*, 2003), potentially explaining the Cd36-null mice lipodystrophy.

It was recently proposed that Wnt signaling is partially regulated by Foxo transcription factors (Almeida et al., 2007; Iyer et al., 2013). The increased Foxol expression in Cd36 deficient MSCs hinted at potential alterations of Wnt signaling. We therefore studied the expression of major Wnt pathway molecules. No change was observed in the expression of Rspo2 and Lrp5/6 co-receptors. However, the Wht3a and Wht5a agonist was found to be 40% less expressed in Cd36-null cells. Furthermore, Wnt antagonists Sost and Dkkl expression was increased over 2-fold compared to WT cells. Thus, the deregulation of Wnt pathway members may be explained, at least in part, by *Foxol* increased expression in *Cd36*-null mice. Sost and Dkk1 both inhibit osteoblast function and bone formation by competing with Wnt for binding sites to LRP5 and LRP6. Transgenic mice overexpressing human SOST exhibit lower bone mass (Loots et al., 2005), as SostKO mice demonstrate higher bone mass with increased bone formation (Li et al., 2008). Similarly, Dkkl haploinsufficiency promotes bone formation through increased Wnt canonical signaling (Morvan et al., 2006), as its overexpression lead to a low bone mass phenotype related to reduced bone formation (Li et al., 2006; Yao et al., 2011).

Binding of β -catenin to FOXOs diverts TCF-mediated to FOXO-mediated transcription, decreasing osteoblastogenesis *in vitro* (Almeida *et al.*, 2007) and attenuating β -catenin/TCF transcription in osteoblast progenitors *in vivo* (Iyer *et al.*, 2013). Activation of the Wnt pathway leads to increased expression of Axin2, which acts as a negative regulator of canonical Wnt signaling through the promotion of β -catenin degradation. Targeted disruption of Axin2 in mice accelerates osteoblast

proliferation and differentiation, and leads to increased matrix mineralization (Yu et al., 2005; Yan et al., 2009). Our results show comparable level of gene expression of Axin2 in WT and null MSCs under basal conditions, as well as following Wnt3a stimulation. However, the expression of Lef1 transcription factor, which mediates the nuclear response to Wnt signals, was diminished in Cd36-null MSCs before treatment, yet reached comparable levels to WT following Wnt3a stimulation, suggesting a similar response for both genotypes. The measure of Wnt signaling activity is needed to clarify the implication of canonical Wnt pathway in Cd36-null mice bone metabolism. Activation of Lef1 by β -catenin leads to transcription of numerous target genes involved in cell proliferation, including CcnD and c-myc (Westendorf et al., 2004). In light of this function, Lef1KO mice are smaller than control littermates, display multiple defects in tissues formed from epithelial and mesenchymal progenitors and die shortly after birth (van Genderen et al., 1994). It has also been reported that Lef1 haploinsufficiency generates a low bone mass phenotype caused by reduced osteoblast function (Noh et al., 2009).

Combined, our findings suggest a significant contribution of CD36 to bone homeostasis, both by directly influencing proliferation and apoptosis of marrow cells, and through systemic modulation of energy metabolism. MSCs lacking CD36 exhibit altered expression of genes involved in the modulation of SHH signaling, cell cycle regulation and canonical Wnt ligands, leading to impaired osteoblast function and reduction of bone mass in *Cd36*-null mice. The exact mechanisms by which CD36 modulates bone mass involve the crosstalk between several pathways. Future studies are needed to investigate further the relationship between CD36 and Wnt signaling molecules.

3.8 Acknowledgments

This work was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research (CIHR). OK is recipient of scholarship from Le Fond de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

3.9 Tables and Figures

Table 3.1 : Sequence of primers for genes expression

Gene	Primers	Accession number		
Axin2	F: 5'-CCTGACCAAACAGACGACGA-3'	AF205889.1		
	R: 5'-CACCTCTGCTGCCACAAAAC-3'			
β-	F: 5'-TACTCACGCCACCCACCGGAG-3'	NM_009735.		
microglobulin	R: 5'-GCTCGGCCATACTGGCATGCT-3'	3		
CcnD1	F: 5'-CAAAATGCCAGAGGCGGATG-3'	NM_007631.		
	R: 5'-GAAAGTGCGTTGTGCGGTAG-3'	2		
CcnA2	F: 5'-ACCTGCCTTCACTCATTGCT-3'	NM_009828.		
	R: 5'-AGGTCTGGTGAAGGTCCACA-3'	2		
Dkk1	F: 5'-CGGTTCTTGGCCGTGTTTAC-3'	JN966751.1		
	R: 5'-GAGCAGTACTCGTCAGAGCC-3'			
Foxo1	F: 5'-GCTCTGTGCGCCTAAGTACA-3'	NM_019739.		
	R: 5'-CCGATGGACGGAATGAGAGG-3'	3		
Gli-I	F: 5'-GGTCTCGGGGTCTCAAACTG-3'	NM_010296.		
	R: 5'-TGTAGTGCTGAGCAGGTGTG-3'	2		
Lef1	F: 5'-TTCAAGGACGAAGGCGATCC-3'	NM_010703.		
	R: 5'-CTCTGGCCTTGTCGTGGTAG -3'	4		
Lep	F: 5'-TGCGGCCCAGGAGAGGTGAG-3'	NM_008493.		
	R: 5'-AAGCAGCACCCCAGGAGCCT-3'	3		
Lrp5	F: 5'-AAGGTTGTCGGAACCAACCC-3'	NM_008513.		
	R: 5'-CCTCGGGGGATTATGCAGGTC-3'	3		
Lrp6	F: 5'- TCCAACGTGTTCTCCTCAGC -3'	NM_008514.		
	R: 5'- CATCGCCATTGACTCGAAGG-3'	4		
Ppary	F: 5'- CTGCTCAAGTATGGTGTCCATGA- 3'	NM_0011273 30.2		
	R: 5'-TGAGATGAGGACTCCATCTTTATTCA-3'			
Rspo2	F: 5'-AGCGAATGGGGAACGTGTAG-3'	NM_172815.		
	R: 5'-CTTGCATCTCCTGGACTCCG-3'	3		
Sost	F: 5'-CAGGAATGATGCCACAGAGGT-3'	NM_024449.		
	R: 5'-GTCTGTCAGGAAGCGGGTG-3'	6		
Sox9	F: 5'-CCACCATGTCGGAGGACTCG-3'	NM_011448. 4		
	R: 5'-GGATGCACACGGGGGAACTT-3'			

Wnt3a	F: 5'-CCTCCGCTGGAGTAGCTTTC-3' R: 5'-GTTGTGACGGTTCATGGCAG-3'	NM_009522. 2	
Wnt5a	F: 5'-GTGATGCAAATAGGCAGCCG-3'	NM_009524.	
	R: 5'-AGCGTGGATTCGTTCCCTTT-3'	3	

 Table 3.2 : Cell cycle analysis by cytometry

Day:	7		14		21	
Genotype:	WT	ко	WT	КО	WT	ко
Phase G0/G1	87.9±3.6	87.8±1.7	90.6±1.2	90.8±2.4	90.9±5.5	88.5±4.7
Phase S/G2/M	11.9±3.4	11.2±1.2	9.4±1.2	8.9±2.8	8.2±4.8	11.0±4.5



Figure 3.1 : Impaired leptin production in Cd36-null mice

Plasma levels of leptin A) and plasma level of adiponectin B) were measured by ELISA in fasting 1-9 months-old WT and Cd36-null mice ($n\geq 5$ per group). Leptin/adiponectin ratio was reduced in Cd36-null mice C). Correlation between total body weight and plasma leptin level was observed in 3-6 month-old Cd36-null mice (n=9) D-E). Data represent mean \pm SEM. Student t-test: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 compared to WT mice.



Figure 3.2 : Chondrogenic status of Cd36-null mice

Gene expression of *Lep* in MSCs from WT and *Cd36*-null mice (n=5) (A). Gene expression of, *Sox-9* (B) and *Col-IIa* (C) in MSCs from WT and *Cd36*-null mice (n=4). Bone sections were used to evaluate grown plate thickness (n=5) (D-E). RZ-resting zone, PZ-proliferative zone, HZ-hypertrophyc zone. Data represent mean \pm SEM. Student t-test: *P<0.05 compared to WT mice.



Figure 3.3 : Proliferation and apoptosis of Cd36-null bone marrow MSCs

Cell count at day 0 of culture A). Cell count or apoptosis assay B) were performed on MSCs isolated from bone marrow of WT and *Cd36*-null mice after 7, 14 and 21 days of culture in differentiation medium. Apoptotic and necrotic MSCs number at day 21 of culture C). Gene expression of *CcnA2* and *CcnD1* in MSCs from WT and *Cd36*-null mice (n=4). Data represent mean \pm SEM of 4 independent experiments. Student t-test: *P<0.05, **P<0.01 compared to WT mice.



Figure 3.4 : Effect of hexarelin and TSP-1 treatment on MC3T3-E1 cells and WT and Cd36-null bone marrow MSCs

Proliferative response of MC3T3-E1 on 96h hexarelin A) and TSP-1 B) treatment (n=3-4). Proliferative response of bone marrow derived WT and Cd36-null MSCs on 96h hexarelin C) and TSP-1 D) treatment (n=3-4). Data represent mean \pm SEM. Student t-test: *P<0.05, ***P<0.001 compared to WT mice, ϵ P<0.05 compared to 0.



Figure 3.5 : Disbalance of *Ppary* and its co-regulators expression in *Cd36*-null mice

Gene expression of *Ppary* A), *Gli-I* B) and *Foxo1* C) in MSCs from WT and *Cd36*-null mice (n=4). Data represent mean \pm SEM. Student t-test: *P<0.05, **P<0.01 compared to WT mice.



Figure 3.6 : Member of Wnt signaling pathway in WT and Cd36-null bone marrow MSCs

Real-time PCR analysis for Lrp5 and Lrp6 receptors and Rspo2 A). Wnt pathway ligands Wnt5a and Wnt3a expression B). Expression of Wnt pathway antagonistes Dkk1 and Sost (n=4-6). Data represent mean \pm SEM. Student t-test: *P<0.05, **P<0.01 compared to WT mice.



Figure 3.7 : Wnt signalling response in WT and *Cd36*-null bone marrow MSCs after 24h stimulation with Wnt3a

Real-time PCR analysis for Wnt pathway transcription targets Lef1 A) and Axin2 B). Data represent mean \pm SEM. Student t-test: *P<0.05, compared to WT mice, ϵ P<0.05, $\epsilon\epsilon$ P<0.01, $\epsilon\epsilon\epsilon$ P<0.001 compared to non-stimulating MSCs.

CHAPITRE IV

DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

4.1 Discussion

Chez les vertébrés la masse osseuse reste constante après la fin de la période de croissance osseuse linéaire grâce à un processus complexe et dynamique appelé remodelage osseux reposant sur l'équilibre de deux mécanismes : la résorption et la formation osseuses. Cet équilibre est primordial afin de préserver les propriétés biomécaniques du tissu osseux et d'assurer l'homéostasie minérale ainsi que de réparer les fractures. Tout déséquilibre du remodelage osseux est à l'origine de pathologies qui peuvent être ostéopéniques ou ostéocondensantes. L'ostéoporose est une des complications les plus graves du déséquilibre du remodelage osseux. Cette condition a un impact négatif sur la qualité de vie des personnes atteintes en plus d'être un fardeau économique important pour le système de santé. L'ostéoporose est l'atteinte dégénérative la plus fréquente dans les pays développés et son incidence est en constante augmentation avec le vieillissement progressif de la population générale. L'étude de la régulation du remodelage osseux devient primordiale afin de mieux comprendre les mécanismes menant à la perte de la masse osseuse et à l'ostéoporose. Ainsi, la compréhension des mécanismes fondamentaux de signalisation cellulaire et de régulation des fonctions ostéoblastiques est importante pour le développement de meilleures approches médicales pour la prévention et le traitement de l'ostéoporose. CD36 est impliqué dans plusieurs processus biologiques, entre autres, dans le métabolisme des acides gras, des lipoprotéines, dans l'athérosclérose, la thrombose, l'inflammation et la vascularisation (Baranova, 2008; Daviet et McGregor, 1997; Silverstein et Febbraio, 2009). Son rôle est grandement étudié dans la biologie des macrophages, des adipocytes, des thrombocytes, des myocytes et plusieurs autres types cellulaires (Abumrad et al., 2000; Apostolov et al., 2009; Febbraio et al., 1999). Toutefois l'implication de CD36 dans le métabolisme osseux ainsi que son rôle dans

la biologie des ostéoblastes ne sont pas encore élucidés. Nous présentons dans ce travail des résultats soulignant l'importance de CD36 dans le maintien de la masse osseuse, son rôle au niveau de la prolifération et de la survie des CSM, ainsi que son influence sur la voie de signalisation Wnt associée à l'ostéogenèse.

4.1.1. La déficience en CD36 est associée à un phénotype ostéoporotique

La formation osseuse est principalement dépendante du nombre d'ostéoblastes différenciés. La différenciation et le fonctionnement ostéoblastiques sont sous le contrôle d'agents systémiques et locaux, tels que les facteurs de transcription, les interactions cellulaires et matricielles, les hormones et les peptides de croissance. Il est important de souligner qu'il n'existe aucun facteur de croissance ni aucune cytokine spécifique au tissu osseux et que tous ces facteurs sont susceptibles d'agir sur d'autres organes. Dans les maladies ostéoporotiques, la balance osseuse est déséquilibrée plutôt dans le sens d'un défaut de la formation osseuse par les ostéoblastes. Les travaux cliniques ont montré que, dans la pathologie ostéoporotique, le déficit de formation osseuse est lié à une diminution de la prolifération des ostéoblastes, et non à une différenciation incomplète de ces cellules. Donc, la réduction du nombre d'ostéoblastes est un de facteurs à l'origine de l'ostéopénie et de la faible masse osseuse (Marie et Kassem, 2011). Dans cette optique, nos résultats sont en accord avec ce mécanisme de la diminution de la masse osseuse. L'étude histologique de coupes d'os après une détection de la TRAP ou de l'ALP indique pour la première fois que l'absence de CD36 chez les souris mène à une diminution du nombre d'ostéoblastes sans avoir d'effet sur le nombre d'ostéoclastes. Au cours des processus ostéoporotiques l'architecture des trabécules de l'os spongieux se modifie : l'espace entre les trabécules osseuses s'accroît, entraînant une disjonction de celles-ci ce qui contribue à fragiliser l'os (Raisz, 2005). Les données cliniques suggèrent que la perte d'os trabéculaire pourrait se situer entre 30% et 50% chez les
femmes âgées de 40 à 80 ans. Ces anomalies apparaissent particulièrement au niveau de l'os trabéculaire des vertèbres lombaires (Guglielmi *et al.*, 2011). En accord avec ces observations, les souris Cd36KO ont une masse osseuse diminuée associée à une augmentation de la porosité de la portion trabéculaire des os longs et des vertèbres, plus accentuée dans le fémur. Par ailleurs, on a constaté que la partie trabéculaire du fémur est plus affectée que la partie corticale chez les souris Cd36KO. Il est connu que le renouvellement global du squelette est plus rapide pour l'os trabéculaire (25% par an), que pour l'os cortical (3 à 4% par an). Pour cette raison, la perte de la masse osseuse serait plus prononcée dans des sites où il existe une proportion relativement importante d'os trabéculaire. Pour compléter l'étude du phénotype osseux chez les souris Cd36KO, il serait intéressant de réaliser des tests biomécaniques de résistance osseuse.

4.1.2 La production de marqueurs de formation osseuse est diminuée chez les souris *Cd36*KO

L'activité ostéoblastique mène à la production et à la sécrétion dans le sang de molécules caractéristiques de la prolifération cellulaire ainsi que de la maturation et de la minéralisation de la matrice extracellulaire (Risteli et Risteli, 1993). Les dosages des marqueurs de formation et de résorption osseuse fournissent une source additionnelle d'informations utiles au diagnostic et au contrôle de l'efficacité du traitement de l'ostéoporose (Delmas *et al.*, 2000). Ils sont aussi utilisés afin de prédire le risque de fracture sous traitement (Lane, 2006).

L'activité des ostéoblastes induit la production d'OCN et d'un indicateur de la synthèse de COL-I, le PINP, qui se libèrent lors de la minéralisation de la matrice. Ces deux facteurs constituent les marqueurs sensibles et spécifiques d'activité ostéoblastique. Malgré que l'expression de *Col-I* soit comparable entre les souris WT

et Cd36KO, nos résultats ont révélé une diminution des niveaux de PINP et d'OCN dans le sang des souris Cd36KO, ce qui suggère une altération du fonctionnement des ostéoblastes en absence de CD36. L'expression génique ne reflète pas toujours la quantité d'une protéine. L'évaluation de COL-I par immunobuvardage du type Western pourrait clarifier son niveau dans les os des souris Cd36KO. Le taux plasmatique d'un autre facteur ostéoblastique, l'ALP, démontre une tendance vers la baisse non significative chez les souris Cd36KO. La mesure de l'ALP sanguine ne permet pas de différencier les isoformes osseuse, hépatique ou encore rénale. L'ALP d'origine osseuse est prédominante chez les enfants et les adolescents, tandis que chez les adultes presque la moitié de l'ALP sanguine est d'origine hépatique (van Hoof et De Broe, 1994). Donc, cette légère diminution du niveau de l'ALP plasmatique chez les souris Cd36KO pourrait être due à la réduction de l'ALP osseuse. En accord avec l'observation d'un nombre d'ostéoclastes comparable entre les souris WT et Cd36KO, des taux normaux de la TRAP et du télopeptide Cterminal du COL-I (CTX) qui témoignent de l'activité ostéoclastique ont été détectés chez les souris déficientes en CD36. Nos résultats démontrent donc une réduction de la concentration de marqueurs de formation osseuse chez les souris Cd36KO, probablement due à l'altération de la fonction ostéoblastique ce qui affecte la formation osseuse et méne à une faible masse osseuse.

4.1.1.3 L'influence des lipides, de l'adiposité et de la leptine sur le phénotype osseux des souris Cd36KO

Le maintien de l'équilibre osseux nécessite aussi l'intervention de nombreuses hormones qui agissent au niveau local ou systémique (Manolagas, 2000). Le fait que la leptine soit considérée comme un facteur régulant le remodelage osseux nous a amené à évaluer ses concentrations plasmatiques ainsi que celles de l'adiponectine chez les souris WT et Cd36KO. Nos résultats démontrent que l'ablation de CD36

provoque une diminution du niveau de leptine sans aucun effet sur le niveau en adiponectine. La leptine est une adipokine sécrétée principalement par les adipocytes matures du tissu adipeux et de nombreuses études chez l'humain et la souris ont montré l'existence d'une étroite corrélation entre son taux plasmatique et l'état des réserves adipeuses (Friedman et Halaas, 1998; Murray et al., 2000; Suzuki et al., 2008). Nos résultats ont révélé une réduction de l'adiposité chez les souris Cd36KO. Une diminution du nombre et de la taille des adipocytes a été rapportée chez les mêmes souris (Vroegrijk et al., 2013). Les données récentes suggèrent l'importance de CD36 dans la formation du tissu adipeux. En effet, l'expression de Cd36 augmente lors de la différenciation de la lignée cellulaire pré-adipocytaire 3T3-F442A en adipocytes matures, tandis que l'interférence par ARN ciblant Cd36 (siARN-Cd36) empêche leur différenciation adéquate. En plus, la formation de novo des coussins adipeux a été réduite chez les souris NUDE injectées avec des pré-adipocytes 3T3-F442A traités avec des siARN-Cd36 (Christiaens et al., 2012). La concentration de la leptine est aussi en corrélation positive avec l'indice de masse corporelle (Monti et al., 2006). Les sécrétions de leptine sont ainsi augmentées chez les obèses et diminuées chez les individus maigres. Les souris Cd36KO présentent une faible masse corporelle et une diminution du tissu adipeux qui pourrait être à l'origine du niveau réduit de leptine circulante.

La leptine est liée à la croissance de plusieurs types cellulaires: hématopoïétique, leucocytaire, pancréatique, hépatique et neuronal (Bennett *et al.*, 1996; Benomar *et al.*, 2006; Konopleva *et al.*, 1999; Paolucci *et al.*, 2006). Elle est aussi connue comme une des hormones qui influencent la masse osseuse. Les travaux récents mettent en évidence le double effet de la leptine au niveau du tissu osseux, en agissant à la fois au niveau du système nerveux central, inhibant la formation et stimulant la résorption osseuse, et activant la formation osseuse *via* une modulation directe du métabolisme des cellules osseuses (Cirmanova *et al.*, 2008). Il n'est toutefois pas encore bien établi quel effet de la leptine, central ou périphérique, est plus prononcé sur le métabolisme

osseux. Des études de l'influence de la leptine sur la formation osseuse ont été réalisées sur les souris déficientes en leptine (ob/ob) et en récepteur de la leptine (db/db). Les travaux initiaux sur ces souris ont suggéré une hausse de la masse osseuse des vertèbres due à l'augmentation de la formation osseuse sans aucune modification de la résorption osseuse (Ducy et al., 2000a). Les études ultérieures ont démontré que ces effets de la leptine sur l'os ne sont pas uniformes sur tout le squelette et dépendent de si l'action est au niveau des régions axiales ou appendiculaires (Hamrick et al., 2004). La déficience en leptine chez les souris ob/ob est associée au raccourcissement du fémur, à une diminution de la masse osseuse, une réduction du volume trabéculaire et cortical du fémur, mais à une augmentation de la taille des trabécules et du volume trabéculaire des vertèbres (Baldock et al., 2006; Hamrick et al., 2005). Des altérations similaires ont été rapportées dans l'os long chez les souris *db/db*, tandis que les vertèbres ont un phénotype opposé à celui des souris ob/ob. Les tibias de souris db/db présentent une réduction du volume trabéculaire et cortical, une diminution de l'épaisseur et du nombre de trabécules et les vertèbres montrent une diminution de l'épaisseur trabéculaire et corticale. L'étude des propriétés mécaniques du fémur de souris db/db a démontré une diminution de la force de l'os et une raideur du tissu osseux (Williams et al., 2011). Nos résultats démontrent une diminution de la masse osseuse de la partie trabéculaire de l'os long et des vertèbres, sans aucun effet sur la partie corticale de l'os long chez les souris Cd36KO. Il est important de noter que les souris déficientes en Ob-R uniquement au niveau des ostéoblastes ne présentent aucun défaut du tissu osseux, tandis que l'absence de ce récepteur dans les neurones entraîne une augmentation de la masse osseuse (Shi et al., 2008). La leptine exerce également un effet sur les cellules ostéoblastiques in vitro. En effet, Thomas et son équipe (Thomas et al., 1999) ont montré que la leptine entraîne la différenciation de CSM humaines en ostéoblastes en inhibant leur différenciation tardive en adipocytes. La leptine augmente la synthèse dans ces cellules des protéines de la matrice osseuse telles que le COL-I et l'OCN (Thomas et al., 1999). L'enrichissement du milieu de culture en leptine augmente la prolifération et stimule la minéralisation des ostéoblastes humains et murins ainsi que des lignées cellulaires ostéoblastiques (Martineau *et al.*, 2014; Takahashi *et al.*, 1997; Trentz *et al.*, 2004). L'ensemble de ces résultats suggère donc que le manque de leptine pourrait être responsable, en partie, du développement de l'ostéopénie chez les souris *Cd36*KO. Afin d'établir le rôle de la leptine chez les souris *Cd36*KO, il serait intéressant d'injecter *in vivo* de la leptine pour voir si l'augmentation de la leptinémie pouvait rétablir le phénotype osseux. Aussi, on pourrait déterminer si les ligands spécifiques pour CD36 (TSP-1 et hexaréline) modifient l'expression de la leptine dans les cellules provenant de souris WT ou dans les modèles ostéoblastiques MC3T3-E1 et MG-63.

Les études épidémiologiques lient le métabolisme lipidique et l'hyperlipidémie à la perte de masse osseuse et à l'ostéoporose (Lacativa et Farias, 2010; Parhami, 2003). Puisque CD36 est impliqué dans le métabolisme des lipides, nous avons mesuré le niveau de cholestérol total, de HDL- et LDL-cholestérol chez les souris *Cd36*KO et WT. Nos résultats sont en accord avec ceux d'une étude de Drover *et al.* 2008 qui ne révèlent aucune différence significative entre les niveaux de cholestérol chez les souris des deux génotypes. En plus, nous avons observé que les souris femelles *Cd36*KO ont tendance à avoir des taux de cholestérol total et de HDL-cholestérol légèrement plus élevés par rapport à ceux des souris mâles. La majorité des études menées sur les souris *Cd36*KO démontrent une augmentation du taux de cholestérol sanguin chez les deux genres (Brundert *et al.*, 2011; Febbraio *et al.*, 1999; Yue *et al.*, 2010). Par contre, une étude indique une diminution du cholestérol total chez les souris mâles (Luangrath *et al.*, 2008). Cette disparité dans les résultats pourrait être due aux différentes méthodes de dosages ou à l'âge des souris testées.

4.1.4 La diminution de la prolifération des CSM contribue à la perte de la masse

osseuse chez les souris Cd36KO

La prolifération in vitro dans le milieu MEM des CSM et des ostéoblastes provenant de souris Cd36KO est réduite suggérant l'importance de CD36 pour une croissance cellulaire optimale. En ce qui concerne la prolifération des mêmes cellules cultivées dans le milieu de différenciation ostéoblastique, on observe la même tendance avec une diminution du niveau de protéines et une réduction de la prolifération des cellules qui n'est pas significative possiblement due au nombre limité d'expériences. Ces données concordent très bien avec la littérature. Plusieurs études ont rapporté que l'absence de Cd36 altère la prolifération et la croissance de certains types cellulaires et méne à des défauts du développement de tissus (Eto et al., 2003; Vroegrijk et al., 2013; Won et al., 2008). Les souris Cd36KO présentent un faible potentiel de génération de phosphoryl choline-specific plasma cells (Won et al., 2008), une diminution du nombre et de la taille des adipocytes (Vroegrijk et al., 2013), un retard dans la myélinisation des fibres nerveuses après une blessure (Eto et al., 2003) et une diminution de masse corporelle (Goudriaan et al., 2003; Hajri et al., 2007). Afin de compléter cette partie de notre étude, on pourrait incuber les cellules sur des temps plus long allant jusqu'à 28 jours pour vérifier si une différence serait observable. En plus, une délétion de Cd36 induit l'arrêt du cycle cellulaire dans la phase S de cellules de muscles lisses vasculaires suggérant une altération des fonctions de la CcnA (Li et al., 2012). Contrairement à ces observations, nos résultats n'ont révélé aucun changement de phases du cycle cellulaire, le niveau d'expression génique de la CcnA2 a été augmenté dans les CSM provenant de souris Cd36KO. Pour vérifier si CD36 est impliqué dans la prolifération des CSM et des cellules MC3T3-E1, nous les avons incubées avec deux ligands connus de CD36, l'hexaréline et la TSP-1. Nos données révèlent une stimulation de la prolifération des CSM provenant de souris WT et des cellules MC3T3-E1 sans aucun effet de ces produits sur les CSM des souris

*Cd36*KO. Donc on pourrait suggérer un rôle de CD36 dans la prolifération des cellules osseuses.

4.1.5 Apoptose accrue des CSM dérivées de souris Cd36KO

Les CSM de souris Cd36KO présentent un taux élevé d'apoptose et de nécrose par rapport aux cellules WT. L'élimination des cellules apoptotiques est généralement assurée par les monocytes circulants, les macrophages et les cellules dendritiques. Lorsque les cellules subissent des changements morphologiques et biochimiques caractéristiques de l'apoptose, elles deviennent alors la cible des macrophages qui les internalisent par endocytose et les détruisent. CD36 est un des récepteurs impliqués dans la reconnaissance et la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages (Bottcher et al., 2006; Fadok et al., 1998; Greenberg et al., 2006). L'inactivation de Cd36 dans les macrophages murins réduit la phagocytose des cellules apoptotiques (Ferracini et al., 2013). Une diminution de l'expression de CD36 dans la muqueuse intestinale observée chez les patients souffrant de la maladie cœliaque mène également à une élimination insuffisante des cellules en apoptose (Cupi et al., 2014). Malgré que le rôle spécifique de CD36 dans la détection des cellules apoptotiques par les ostéoblastes n'ait jamais été rapporté, la capacité des ostéoblastes à internaliser par endocytose les débris apoptotiques a été observée (Cerri, 2005). En plus, la capacité des ostéoblastes de reconnaitre les agents étrangers et de les phagocyter a été démontrée auparavant dans plusieurs études (Cerri, 2005; Heinemann et al., 2000; Lohmann et al., 2000; Takahashi et al., 1986). Les ostéoblastes phagocytent les particules métalliques (Heinemann et al., 2000; Lohmann et al., 2000), les fibres de collagène et la matrice osseuse calcifiée (Takahashi et al., 1986). La phagocytose des particules de métal et de polyéthylène induit des changements morphologiques dans les cellules MG-63 et affecte leur prolifération et leur différenciation (Lohmann et al., 2000). Le mécanisme exact par

lequel les ostéoblastes assurent leur fonction phagocytaire n'a pas été élucidé, mais on ne pourrait pas exclure l'implication de CD36 dans ce processus. L'ensemble de nos résultats pourrait suggérer que l'augmentation de la proportion de cellules apoptotiques dans la culture de CSM provenant de souris *Cd36*KO est due à la diminution de la capacité phagocytaire de ces cellules. Une élimination insuffisante des cellules apoptotiques mène à leur dégradation accompagnée d'une libération et d'une accumulation de produits toxiques dans le milieux extracellulaire (Elliott et Ravichandran, 2010). L'augmentation de niveau de cytotoxines pourrait avoir un effet néfaste sur les cellules voisines en provoquant leur apoptose.

Nos résultats démontrent une augmentation de l'expression de *Gli-I* et de *Foxo1* dans les CSM provenant de souris *Cd36*KO. Gli-1 est un membre de la voie de signalisation Shh impliquée, entre autres, dans l'embryogenèse (revue dans Petrova et Joyner, 2014), la survie cellulaire et l'apoptose (Galvin *et al.*, 2008; Ruiz *et al.*, 2007; Yoshimoto *et al.*, 2012). Il a été montré que la surexpression de *Gli-I* dans les cellules souches neuronales favorise l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Galvin *et al.*, 2008). Le facteur de transcription FOXO1 régule la croissance, la survie, la différenciation et le métabolisme des cellules (Accili et Arden, 2004; Bartel *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2012). La surexpression de *Foxo1* dans les cellules folliculaires granuleuses murines augmente l'expression de gènes menant à l'apoptose et induit l'apoptose de ces cellules (Shen *et al.*, 2012). Donc, l'expression élevée de *Gli-I* et de *Foxo1* dans les CSM de souris *Cd36*KO pourrait contribuer à l'apoptose accrue de ces cellules.

Étant donné l'implication de CD36 dans le métabolisme des lipoprotéines, notamment dans la liaison de LDLox, on ne peut pas exclure la possibilité d'une implication de ces dernières dans l'apoptose des CSM. Les études menées sur plusieurs types cellulaires, tels que les cellules endothéliales coronaires humaines (Li et Mehta, 2000), les cellules musculaires lisses (Kataoka *et al.*, 2001) et les

macrophages (Hardwick *et al.*, 1996) ont démontré que l'exposition aux LDLox les rend susceptibles à l'apoptose. De plus, il a été démontré que les LDLox induisent également la mort cellulaire par apoptose des cellules ostéoblastiques SaOS (Klein *et al.*, 2003) et des cellules ostéoblastiques MG-63 et MC3T3-E1 (Brodeur *et al.*, 2008b). Afin d'approfondir l'étude de l'apoptose dans les ostéoblastes, nous aurions pu utiliser l'essai TUNEL sur les coupes d'os ou encore injecter du BrdU et de l'iodure de propidium *in vivo* chez les souris WT et *Cd36*KO. L'étude de comportement (viabilité, prolifération, apoptose) de CSM WT et *Cd36*KO exposées aux LDLox, ainsi que de l'expression des gènes et des protéines impliqués dans le processus de l'apoptose, pourraient compléter cette partie de notre recherche.

4.1.6 L'engagement des CSM dans la voie ostéogénique

Les ostéoblastes proviennent de CSM qui donnent naissance à plusieurs types cellulaires sous le contrôle de facteurs de transcription spécifiques. Ainsi, le PPAR γ , exprimé dans les CSM (Elbrecht *et al.*, 1996), est un facteur de transcription essentiel à l'adipogenèse. Un traitement à la rosiglitazone (un agoniste de PPAR γ) de cellules pluripotentes UAMS-33 transfectées avec le PPAR γ 2 mène à l'apparition de cellules semblables à des adipocytes et empêche la formation de la matrice minéralisée (Lecka-Czernik *et al.*, 1999). Les souris avec une haplo-insuffisance pour le gène de *Ppary* ont une masse osseuse élevée, une formation osseuse et une ostéoblastogenèse augmentées ainsi qu'une réduction de l'adiposité osseuse (Akune *et al.*, 2004). La stimulation de CD36 régule à la hausse le PPAR γ dans les macrophages et les adipocytes (Tontonoz *et al.*, 1998; Avallone *et al.*, 2006). Le niveau d'expression de *Ppary* est élevé dans les CSM de souris *Cd36*KO. Le PPAR γ est impliqué dans une multitude de processus métaboliques et la régulation de son expression ne se fait pas seulement par l'activation de CD36. Les facteurs de croissance, les facteurs de transcription, le TNF, les LDLox, les acides gras polyinsaturés sont connus pour

augmenter l'expression de *Ppary* (Demers *et al.*, 2008; Lee et Kai, 2014). Bien que la maturité des ostéoblastes n'ait pas été affectée, les CSM provenant de souris avec une haplo-insuffisance pour le gène de *Ppary* expriment davantage les marqueurs précoces des ostéoblastes, suggérant que la masse osseuse élevée a comme source un engagement accru dans la voie des précurseurs ostéoblastiques par rapport à celle des précurseurs adipocytaires (Kawaguchi *et al.*, 2005). En revanche, une expression accrue de *Ppary2* dans les CSM entraîne une augmentation de l'adiposité de la moelle et l'inhibition de l'ostéoblastogenèse, très probablement en raison de la suppression de l'expression du facteur de transcription pro-ostéogénique *Runx2* (Liu *et al.*, 2010; Shockley *et al.*, 2009).

Nos résultats démontrent une augmentation de l'expression de *Ppary* dans les CSM provenant de souris Cd36KO et une diminution de l'expression de *Runx2* chez les mêmes souris. Ceci suggère un engagement réduit des cellules dans la voie ostéogénique. Le mécanisme exact responsable de cette modification sélective des gènes n'a pas été clairement établi, mais il est probable que les signaux intracellulaires induits par les agents systémiques soient impliqués dans ce processus. Comme mentionné plus haut, les souris Cd36KO ont des niveaux réduits de leptine circulante. Il a été démontré que la leptine entraîne la différenciation des CSM humaines en ostéoblastes tout en inhibant leur différenciation tardive en adipocytes et augmente la synthèse des protéines de la matrice osseuse telles que le COL-I et l'OCN (Thomas *et al.*, 1999). Ces facteurs pourraient également contribuer à expliquer la faible masse osseuse observée chez les souris Cd36KO.

4.1.7 Modulation de l'expression de facteurs de transcription et de marqueurs des ostéoblastes chez les souris Cd36KO

Nos résultats démontrent une réduction de l'expression des facteurs de transcription Runx2 et Osx dans les CSM provenant de souris Cd36KO. Les facteurs de transcription RUNX2 et OSX jouent un rôle crucial dans l'ostéoblastogenèse. Pendant le développement osseux, RUNX2 augmente le nombre d'ostéoblastes immatures et induit leur différenciation ostéoblastique, ce qui permet la formation de l'os primaire. RUNX2, un régulateur important de l'OCN (Ducy et al., 2000b), module également l'expression de l'Osx qui agit en aval de RUNX2 dans la régulation de la différenciation des ostéoblastes (Nakashima et al., 2002). Une délétion de ces deux gènes mène à l'apparition de défauts graves du tissu osseux, tels que l'absence de l'ossification et l'arrêt de la maturation des ostéoblastes (Komori et al., 1997; Nakashima et al., 2002). L'haplo-insuffisance pour le gène Runx2 lors de mutations hétérozygotes est responsable de la dysplasie cléido-crânienne accompagnée de défauts de formation des os médians tels que les clavicules (Lee et al., 1997). À l'inverse, la surexpression de Runx2 accélère la maturation des ostéoblastes, augmente l'expression du Col-I et de l'Ocn et favorise la minéralisation de la matrice osseuse (Byers et Garcia, 2004; Byers et al., 2002; Zhao et al., 2005). Les CSM déficientes en CD36 expriment moins d'Ocn et de Bsp, ce qui pourrait être causé par la diminution de l'expression de Runx2, mais le taux d'expression de Col-I reste stable. Il existe des mécanismes RUNX2-indépendants dans la régulation de l'expression du Col-I, notamment via la phosphorylation de l'OSX par les MAPKs p38 et ERK (Ortuno et al., 2010; Ortuno et al., 2013). Donc, lorsque RUNX2 ou OSX sont absents, l'expression du Col-I est sévèrement affectée. Par contre, lorsque RUNX2 est diminué dans une certaine mesure, les voies RUNX2-indépendantes sont suffisantes pour compenser l'expression du Col-I dans les cellules osseuses (Tanaka et al., 2012), qui est d'ailleurs exprimé dans divers autres tissus n'exprimant pas RUNX2 ni OSX, tels que la peau et les poumons (Epstein et Munderloh, 1978; Raghu

et al., 1989). Une insuffisance en OCN et BSP pourrait être responsable de la faible masse osseuse chez les souris Cd36KO. RUNX2 est une cible de la β -caténine/TCF1 dans la stimulation de la formation osseuse et son expression dépend directement de la signalisation Wnt (Gaur *et al.*, 2005). Les CSM de souris Cd36KO présentent une diminution de *Wnt3a* et de *Wnt5a* ce qui pourrait réduire l'expression de *Runx2* et engendrer un faible potentiel d'ostéogenèse. Pour continuer à étudier l'impact de la déficience en CD36 sur les facteurs ostéogéniques on pourrait explorer des éléments de la signalisation Wnt et des marqueurs des ostéoblastes à la suite d'un traitement des CSM avec le Wnt3a.

4.1.8 La voie Wnt est impliquée dans la formation du phénotype ostéopénique chez les souris *Cd36*KO

L'équilibre entre l'adipogenèse et l'ostéoblastogenèse est, entre autres, influencé par la communication croisée entre le PPAR γ 2, spécifique aux adipocytes, et la voie Wnt. L'isoforme PPAR γ 2 réduit la signalisation Wnt *via* la stimulation de la dégradation de la β -caténine par les protéasomes (Moldes *et al.*, 2003). Il a également été démontré que la β -caténine elle-même est indispensable à l'ostéoblastogenèse dans l'embryon de souris (Hu *et al.*, 2005), et que l'activation directe de la β -caténine favorise la différenciation des ostéoblastes et supprime l'adipogenèse. Le trio Wnt-LRP5/6- β -caténine est connu pour exercer un effet anabolique sur le tissu osseux. Wnt5a induit l'expression de *Runx2* et stimule l'ostéoblastogenèse, tandis que l'haplo-insuffisance pour le gène *Wnt5a* réduit l'ostéoblastogenèse (Takada *et al.*, 2007). Nos résultats démontrent une diminution de l'expression génique de *Wnt3a* et de *Wnt5a* lass les CSM de souris *Cd36*KO, sans aucun modification d'expression des co-récepteurs *Lrp5/6*. Un agoniste de la voie Wnt, la RSPO2, peut aussi moduler la formation du tissu osseux. Une carence en RSPO2 entraîne des anomalies du développement du squelette (Hankenson *et al.*, 2010). Par contre, l'expression de *Rspo2* n'a pas été altérée chez les souris *Cd36*KO.

Deux facteurs impliqués dans la signalisation Wnt, SOST et DKK1, inhibent la voie Wnt-LRP5/6 et régulent négativement la masse osseuse. L'expression des gènes de Sost et de Dkkl a été régulée à la hausse chez les souris Cd36KO. Il a été démontré précédemment que les souris transgéniques surexprimant Sost ont un phénotype ostéopénique (Kramer et al., 2010; Loots et al., 2005). L'analyse par micro-CT révèle qu'elles ont une diminution du volume osseux, du nombre et de l'épaisseur des trabécules avec une augmentation de l'espace intertrabéculaire (Loots et al., 2005). Inversement, les souris SostKO présentent une masse osseuse élevée avec une augmentation considérable de la formation et de la résistance osseuse (Lin et al., 2009). Le DKK1 provoque également une ostéopénie en inhibant la voie Wnt. Les souris Dkk1 hétérozygotes présentent une augmentation de la masse osseuse et de la résistance osseuse, une diminution de lésions ostéolytiques et de la destruction osseuse avec l'apparition d'ostéophytes (MacDonald et al., 2007; Morvan et al., 2006). Il a été constaté qu'une réduction progressive de DKK1 augmente la masse osseuse trabéculaire et corticale chez les souris. En plus, il a été démontré que la signalisation SHH, connue notamment pour stimuler l'expression de Sox9 (Park et al., 2010), régule négativement la voie Wnt (Akiyoshi et al, 2006; Ma et al., 2015). L'expression accrue de Gli-1 est un indicateur de l'activation de la voie SHH. Les CSM de souris Cd36KO expriment davantage Gli-1 ce qui pourrait être un des mécanismes de variations du niveau d'expression des molécules impliquées dans la voie Wnt. Afin de savoir si la signalisation Wnt est réduite chez les souris Cd36KO, il aurait fallu mesurer directement l'activité Wnt canonique. Nos résultats suggèrent que l'altération de la voie Wnt chez les souris Cd36KO pourrait réduire le recrutement des CSM vers l'ostéoblastogenèse et être responsable de la diminution du nombre d'ostéoblastes (Fig 2.5 B, C) et de l'apparition du phénotype ostéopénique chez ces souris.

Il n'y pas de donnée concernant l'influence de CD36 sur la voie de signalisation Wnt. Très peu d'études portent sur l'effet des acteurs de la voie Wnt sur l'expression de Cd36. Il a été rapporté que l'expression de Wnt1 est corrélée positivement avec l'expression de Cd36 dans des macrophages humains (Wang *et al.*, 2015). Une diminution de l'expression de Dkk1 dans le placenta de rats obèses est associée à l'augmentation de l'expression de Cd36 (Strakovsky et Pan, 2012). Donc, on pourrait suggérer une étude *in vitro* avec des ostéoblastes transfectés avec Dkk1 ou Sost et observer l'expression de Cd36. En plus, l'étude des niveaux plasmatiques de DKK1 et de SOST dans le sang des souris Cd36KO pourrait être faite.

4.1.9 L'engagement des CSM dans la voie chondrogénique

Les CSM possèdent une certaine plasticité et peuvent se différencier en plusieurs types de cellules tels que les chondrocytes, les ostéoblastes, les myocytes et les adipocytes. Cependant, les cellules progénitrices de la condensation mésenchymale précoce ont seulement deux choix au cours de leur différenciation. En effet, puisqu'elles expriment SOX9 et RUNX2, elles peuvent devenir soit des chondrocytes, soit des ostéoblastes. Nous avons étudié l'expression du facteur de transcription *Sox9* et du marqueur des chondrocytes matures *Col-IIa* dans les CSM provenant de souris WT et *Cd36*KO. Les cellules déficientes en CD36 expriment plus de *Sox9*, un facteur de transcription chondrocytaire: par contre l'expression du *Col-IIa*, un marqueur des chondrocytes matures n'était pas modifié dans ces cellules. La croissance de l'os en longueur part de la plaque de croissance vers la partie terminale de l'os et est régulée par l'hormone de croissance somatotrope, les hormones thyroïdiennes (T3 et T4) et les hormones sexuelles, la testostérone et l'œstrogène. La morphologie des zones de la plaque de croissance chez les souris

Cd36KO et WT n'a pas révélé de modifications de ces zones. En accord avec ces résultats, la longueur des os n'a pas été affectée chez les souris Cd36KO. La surexpression de *Sox9* semble donc être un mécanisme compensatoire permettant aux cellules déficientes en CD36 d'effectuer une ossification endochondrale normale. Ce facteur de transcription en combinaison avec les autres anomalies relevées pourrait également agir sur l'expression des acteurs de la voie Wnt.

Les mécanismes exacts qui déterminent la destination de la différenciation terminale des cellules mésenchymateuses ne sont pas encore complètement élucidés. Il a été suggéré que la voie Wnt canonique dans les CSM joue un rôle essentiel dans le contrôle de la différenciation des ostéoblastes et des chondrocytes (Bodin et al., 2006; Day et al., 2005). Une signalisation Wnt/β-caténine ectopique inhibe la différenciation des chondrocytes et favorise l'ossification. À l'inverse, lorsque la βcaténine est génétiquement inactivée la différenciation ostéoblastique est remplacée par la formation de chondrocytes (Day et al., 2005). SOX9 inhibe la signalisation Wnt canonique en favorisant la séquestration et la dégradation de la β-caténine par l'ubiquitination (Akiyama et al., 2004). L'activité de la signalisation Wnt est régulée à la baisse dans les chondrocytes en différenciation dans lesquels SOX9 est exprimé (Day et al., 2005), et un des mécanismes par lesquels SOX9 favorise la différenciation des chondrocytes est l'inhibition de la signalisation Wnt/β -caténine. Afin d'élucider la capacité de CSM déficientes en CD36 à s'engager dans la différenciation en d'autres types cellulaires, l'étude du comportement des CSM dans les milieux chondro- ou adipogénique pourrait être envisagée. De plus, il serait intéressant de mesurer les niveaux d'expression des ligands Wnt dans les cellules déficientes en CD36 après un traitement avec un siARN-Sox9.

4.2 Conclusion

Le développement de meilleurs traitements contre l'ostéoporose nécessite une meilleure compréhension des mécanismes de régulation du processus de remodelage osseux afin de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques. Bien que l'importance de CD36 dans de nombreux processus biologiques soit bien établie, son implication dans la biologie des ostéoblastes reste mal caractérisée jusqu'à maintenant.

Le premier objectif de cette thèse était d'étudier les conséquences de la déficience en CD36 sur les paramètres de microarchitecture osseuse chez la souris. Les travaux présentés dans cette thèse démontrent que l'absence de CD36 mène à une diminution de la masse osseuse due à l'altération de la portion trabéculaire de l'os long. La conclusion majeure de cette étude est que CD36 est implicé dans le maintien de la masse osseuse. Un autre objectif de cette thèse était de déterminer le rôle de CD36 dans la physiologie des cellules osseuses. Cette question a été abordée par des approches de biologie cellulaire. Les travaux présentés ici démontrent que l'ablation de CD36 conduit à une diminution de la prolifération et de la survie des ostéoblastes. Un dernier objectif de cette étude était de mieux comprendre l'effet de la déficience en *Cd36* sur le potentiel de différenciation ostéogénique des CSM et sur la voie de signalisation Wnt. Les résultats indiquent une réduction d'engagement des CSMs dans la voie ostéogénique et une diminution de la signalisation Wnt.

4.3 Perspectives

Cette étude a été effectuée avec des souris déficientes en CD36. Donc, certains effets observés, comme l'affection de la microarchitecture osseuse, pourraient être dus à l'absence globale de CD36 et donc attribuables à des effets systémiques indirects. Il serait alors intéressant de créer un modèle de souris avec une ablation de CD36 spécifique aux ostéoblastes, ou encore spécifique aux adipocytes. Pour ce faire, il

faudrait générer des souris chez lesquelles le gène de Cd36 comprend des insertions Flox de part et d'autres, et les croiser avec 1) des souris avec des insertions Cre au niveau de gènes spécifiques aux ostéoblastes, tels que $Col24\alpha I$ ou Ocn, afin d'exciser le gène Cd36 au niveau des ostéoblastes seulement, ou 2) des souris comprenant une insertion Cre au niveau d'un gène spécifique aux adipocytes, tels que Ppary2 ou $C/EBP\alpha$. Ceci permettrait de discriminer les effets spécifiques aux cellules ostéoblastiques de ceux induits par les faibles niveaux de leptine circulante. Comme nous avons vu dans l'introduction, plusieurs études ont été menées au cours des dernières années afin de mieux comprendre l'effet de ligands de CD36 sur sa voie de signalisation dans les différents types cellulaires tels que les macrophages, les cellules endothéliales de la microvasculature, les érythrocytes infectés par Pl. falciparum et les microglies (El-Yassimi et al., 2008; Janabi et al., 2000; Jimenez et al., 2000; Moore et al., 2002; Rahaman et al., 2006; Silverstein et Febbraio, 2009). Les acteurs impliqués dans la signalisation de CD36 lors d'induction de l'athérogenèse, de l'apoptose et de l'inflammation sont bien connus. À cet effet, il serait pertinent d'identifier les voies de signalisation déclanchées par l'activation de CD36 et leurs effets dans les cellules osseuses, plus particulièrement dans les ostéoblastes. Par exemple, les membres de la famille des kinases SRC sont impliqués dans la cascade de signalisation induite par l'activation de CD36 conduisant à l'activation des MAPK (Bamberger et al., 2003; Rahaman et al., 2006). L'utilisation de ligands tels que la TSP-1, l'hexaréline et le EP80317, un ligand synthétique qui lie exclusivement CD36 (Marleau et al., 2005), pourrait être envisagée. À l'aide d'une étude de coimmunoprécipitation, on pourrait déterminer si ces ligands entraînent le recrutement des kinases SRC dans les préostéoblastes murins MC3T3-E1 ou dans les cellules d'ostéosarcome humaine MG63 et la formation d'un complexe avec CD36. On pourrait aussi étudier l'effet des ligands de CD36 sur les lignées MC3T3-E1 ou MG63 et sur les CSM provenant de souris WT. On pourrait envisager étudier le potentiel de différenciation par des mesures d'activité de l'ALP et de minéralisation de la matrice extracellulaire en utilisant la coloration des cristaux de calcium au rouge

alizarine. Aussi, on pourrait étudier l'apoptose et le cycle cellulaire, ainsi que l'expression de gènes ostéoblastiques et de membres de la voie de signalisation Wnt suite à un traitement à des ligands de CD36.

CD36 s'associe avec d'autres récepteurs transmembranaires comme les intégrines $\alpha 6$ - $\beta 1$ et $\alpha 3$ - $\beta 1$, le SRA, la cavéoline-I et le TLR2/6 (Bamberger *et al.*, 2003; Kuchibhotla *et al.*, 2008; Stuart, 2005; Thorne *et al.*, 2000; Truong *et al.*, 2010). Il serait intéressant d'identifier les co-récepteurs de CD36 dans les ostéoblastes et leurs possibles rôles dans le métabolisme du tissu osseux. Pour ce faire, on pourrait utiliser la méthode de co-immunoprécipitation. L'activation parallèle de deux récepteurs peut être perçue comme un inconvénient causé par un manque de spécificité, mais elle pourrait agir comme avantage en induisant une réponse cellulaire distincte dépendante de l'expression des deux récepteurs (Triantafilou *et al.*, 2007) comparativement à la situation d'un seul récepteur.

Pour compléter l'étude du phénotype osseux chez les souris Cd36KO, il serait intéressant de réaliser des tests biomécaniques de résistance osseuse. Brièvement, un test de flexion latérale est appliqué à des os frais au niveau de la diaphyse, à l'aide d'un appareil spécialisé mesurant simultanément le déplacement latéral de l'os et la force appliquée (Jepsen *et al*, 2015). Cette expérience permet de déterminer divers paramètres matériels et géométriques des os, tels que la force maximale, la raideur, la rigidité et le modulus élastique. Ces paramètres permettent de comparer des os ayant subi différents traitements ou provenant de divers modèles murins.

Pour une croissance normale et un bon fonctionnement, le tissu osseux doit être adéquatement vascularisé. L'importance majeure des vaisseaux pour le modelage osseux est bien décrite non seulement pendant la croissance, mais aussi dans la réparation des fractures, lors de l'implantation de matériaux et dans le cadre de l'ingénierie tissulaire osseuse. Étant donné que CD36 est impliqué dans l'angiogenèse et la médiation du signal antiangiogénique (Jimenez et al., 2000), il serait intéressant d'étudier la vascularisation de l'os chez les souris Cd36KO. L'évaluation de la micro-vascularisation des échantillons osseux pourrait être faite par la technique de l'imagerie négative. Pour ce faire, les échantillons d'os préalablement séchés de souris WT et Cd36KO doivent être numérisés et la couleur d'image doit être inversée afin de visualiser les endroits peu denses de l'os cortical qui correspondent aux vaisseaux sanguins. On pourrait utiliser également la visualisation des vaisseaux aux rayons-X après injection d'un produit de contraste, telle que la mousse au sulfate de barium. Afin de confirmer l'état de la microvascularisation et de visualiser les cellules endothéliales, une méthode d'immunohistochimie pourrait être utilisée à l'aide d'anticorps dirigés contre CD31. Le marquage au CD31 pourrait être réalisé sur des coupes de tissu osseux fixé au formol, décalcifié et enrobé de paraffine. Afin d'étudier les facteurs impliqués dans l'angiogenèse, les CSM provenant de souris Cd36KO et WT pourraient être traitées au CoCl₂, un inducteur d'hypoxie, ou à des ligands de CD36 (hexareline, TSP-1, EP80317). L'expression basale et après traitement, de COX-2 et de VEGF pourrait être étudiée par RT-PCR et par immunobuvardage de type Western.

Il existe plusieurs polymorphismes de CD36 chez l'humain. Afin d'étudier leur impact sur l'os, ces variants génétiques pourraient être transfectés dans des cellules ostéoblastiques. Les variants ayant un effet sur les ostéoblastes pourraient être utilisés pour générer des souris mutantes portant ces polymorphismes et ainsi vérifier s'ils modifient un phénotype osseux *in vivo*. Dans ce cas, certains polymorphismes de CD36 pourraient donc être utilisés comme facteur de risque pour le développement de l'ostéopénie ou de l'ostéoporose chez l'humain.

RÉFÉRENCES

Abad, V., J. L. Meyers, M. Weise, R. I. Gafni, K. M. Barnes, O. Nilsson, J. D. Bacher et J. Baron (2002). The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis. *Endocrinology*, 143, 1851-1857.

Abumrad, N. A., M. R. el-Maghrab, E. Z. Amr, E. Lopez et P. A. Grimaldi (1993). Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J Biol Chem*, 268, 17665-17668.

Abumrad, N. A., Z. Sfeir, M. A. Connelly et C. Coburn (2000). Lipid transporters: membrane transport systems for cholesterol and fatty acids. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 3, 255-262.

Accili, D. et K. C. Arden (2004). FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell*, 117, 421–426.

Acton, S., A. Rigotti, K. T. Landschulz, S. Xu, H. H. Hobbs et M. Krieger (1996). Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*, 271, 518-520.

Adachi S., H. Ito, M. Tamamori-Adachi, Y. Ono, T. Nozato, S. Abe, M. Ikeda, F. Marumo et M. Hiroe (2001). Cyclin A/cdk2 activation is involved in hypoxiainduced apoptosis in cardiomyocytes. *Circ Res*, 88, 408-414.

Addison, W. N., F. Azari, E. S. Sorensen, M. T. Kaartinen et M. D. McKee (2007). Pyrophosphate inhibits mineralization of osteoblast cultures by binding to mineral, up-regulating osteopontin, and inhibiting alkaline phosphatase activity. *J Biol Chem*, 282, 15872-15883.

Agueda, L., R. Velazquez-Cruz, R. Urreizti, G. Yoskovitz, P. Sarrion, S. Jurado, R. Guerri, N. Garcia-Giralt, X. Nogues, L. Mellibovsky et al. (2011). Functional relevance of the BMD-associated polymorphism rs312009: novel involvement of RUNX2 in LRP5 transcriptional regulation. *J Bone Miner Res*, 26, 1133-1144.

Aitman, T. J., L. D. Cooper, P. J. Norsworthy, F. N. Wahid, J. K. Gray, B. R. Curtis, P. M. McKeigue, D. Kwiatkowski, B. M. Greenwood, R. W. Snow et al. (2000). Malaria susceptibility and CD36 mutation. *Nature*, 405, 1015-1016.

Akiyama, H., M. C. Chaboissier, J. F. Martin, A. Schedl et B. de Crombrugghe (2002). The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the

chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev*, 16, 2813-2828.

Akiyama, H., J. P. Lyons, Y. Mori-Akiyama, X. Yang, R. Zhang, Z. Zhang, J. M. Deng, M. M. Taketo, T. Nakamura, R. R. Behringer et al. (2004). Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev*, 18, 1072-1087.

Akiyoshi, T., M. Nakamura, K. Koga, H. Nakashima, T. Yao, M. Tsuneyoshi, M. Tanaka et M. Katano (2006). Gli1, downregulated in colorectal cancers, inhibits proliferation of colon cancer cells involving Wnt signalling activation. *Gut*, 55, 991–999.

Akune, T., S. Ohba, S. Kamekura, M. Yamaguchi, U. I. Chung, N. Kubota, Y. Terauchi, Y. Harada, Y. Azuma, K. Nakamura et al. (2004). PPARgamma insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J Clin Invest*, 113, 846-855.

Alikhani, M., Z. Alikhani et D.T. Graves (2005). FOXO1 functions as a master switch that regulates gene expression necessary for tumor necrosis factor-induced fibroblast apoptosis. *J Biol Chem*, 280, 12096–12102.

Almeida, M., L. Han, M. Martin-Millan, C. A. O'Brien et S. C. Manolagas (2007). Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting betacatenin from T cell factor- to forkhead box O-mediated transcription. *J Biol Chem*, 282, 27298-27305.

Andersen, M., B. Lenhard, C. Whatling, P. Eriksson et J. Odeberg (2006). Alternative promoter usage of the membrane glycoprotein CD36. *BMC Mol Biol*, 7, 8.

Anderson, H. C., R. Garimella et S. E. Tague (2005). The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. *Front Biosci*, 10, 822-837.

Apostolov, E. O., S. V. Shah, D. Ray et A. G. Basnakian (2009). Scavenger receptors of endothelial cells mediate the uptake and cellular proatherogenic effects of carbamylated LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29, 1622-1630.

Armesilla, A. L. et M. A. Vega (1994). Structural organization of the gene for human CD36 glycoprotein. *J Biol Chem*, 269, 18985-18991.

Asch, A. S., J. Barnwell, R. L. Silverstein et R. L. Nachman (1987). Isolation of the thrombospondin membrane receptor. *J Clin Invest*, 79, 1054-1061.

Asch, A. S., I. Liu, F. M. Briccetti, J. W. Barnwell, F. Kwakye-Berko, A. Dokun, J. Goldberger et M. Pernambuco (1993). Analysis of CD36 binding domains: ligand specificity controlled by dephosphorylation of an ectodomain. *Science*, 262, 1436-1440.

Atsuta, J., S. A. Sterbinsky, J. Plitt, L. M. Schwiebert, B. S. Bochner et R. P. Schleimer (1997). Phenotyping and cytokine regulation of the BEAS-2B human bronchial epithelial cell: demonstration of inducible expression of the adhesion molecules VCAM-1 and ICAM-1. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 17, 571-582.

Avallone, R., A. Demers, A. Rodrigue-Way, K. Bujold, D. Harb, S. Anghel, W. Wahli, S. Marleau, H. Ong et A. Tremblay (2006). A growth hormone-releasing peptide that binds scavenger receptor CD36 and ghrelin receptor up-regulates sterol transporters and cholesterol efflux in macrophages through a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent pathway. *Mol Endocrinol*, 20, 3165-3178.

Bado, A., S. Levasseur, S. Attoub, S. Kermorgant, J. P. Laigneau, M. N. Bortoluzzi, L. Moizo, T. Lehy, M. Guerre-Millo, Y. Le Marchand-Brustel et al. (1998). The stomach is a source of leptin. *Nature*, 394, 790-793.

Baldock, P. A., S. Allison, M. M. McDonald, A. Sainsbury, R. F. Enriquez, D. G. Little, J. A. Eisman, E. M. Gardiner et H. Herzog (2006). Hypothalamic regulation of cortical bone mass: opposing activity of Y2 receptor and leptin pathways. *J Bone Miner Res*, 21, 1600-1607.

Balla, B., J.P. Kósa, J. Kiss, A. Borsy, J. Podani, I. Takács, A. Lazáry, Z. Nagy, K. Bácsi, G. Speer et al. (2008). Different gene expression patterns in the bone tissue of aging postmenopausal osteoporotic and non-osteoporotic women. *Calcif Tissue Int*, 82, 12-26.

Ballock, R. T. et R. J. O'Keefe (2003). Physiology and pathophysiology of the growth plate. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 69, 123-143.

Bamberger, M. E., M. E. Harris, D. R. McDonald, J. Husemann et G. E. Landreth (2003). A cell surface receptor complex for fibrillar beta-amyloid mediates microglial activation. *J Neurosci*, 23, 2665-2674.

Banfi, A., A. Muraglia, B. Dozin, M. Mastrogiacomo, R. Cancedda et R. Quarto (2000). Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Exp Hematol*, 28, 707-715.

Banks, L. M., B. Lees, J. E. MacSweeney et J. C. Stevenson (1994). Effect of degenerative spinal and aortic calcification on bone density measurements in postmenopausal women: links between osteoporosis and cardiovascular disease? *Eur J Clin Invest*, 24, 813-817.

Bao, Y., L. Qin, E. Kim, S. Bhosle, H. Guo, M. Febbraio, R.E. Haskew-Layton, R. Ratan et S. Cho (2012). CD36 is involved in astrocyte activation and astroglial scar formation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 32, 1567-1577.

Baranova, I. N., R. Kurlander, A. V. Bocharov, T. G.Vishnyakova, Z. Chen, A.T. Remale, G. Csako, A.P. Patterson et T. L. Eggerman (2008). Role of human CD36 in bacterial recognition, phagocytosis, and pathogen-induced JNK-mediated signaling. *J Immunol*, 181, 7147-7156.

Barlind, A., N. Karlsson, N. D. Aberg, T. Bjork-Eriksson, K. Blomgren et J. Isgaard (2010). The growth hormone secretagogue hexarelin increases cell proliferation in neurogenic regions of the mouse hippocampus. *Growth Horm IGF Res*, 20, 49-54.

Baron, R. (2001). L'ostéoclaste et les mécanismes moléculaires de la résorption osseuse. Synthèse, 17, 1260-1269.

Baron, R. et M. Kneissel (2013). WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med*, 19, 179-192.

Bartell, S. M., S. Rayalam, S. Ambati, D. R. Gaddam, D. L. Hartzell, M. Hamrick, J. X. She, M. A. Della-Fera et C. A. Baile (2011). Central (ICV) leptin injection increases bone formation, bone mineral density, muscle mass, serum IGF-1, and the expression of osteogenic genes in leptin-deficient ob/ob mice. *J Bone Miner Res*, 26, 1710-1720.

Barthel, A., D. Schmoll et T. G. Unterman (2005). FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends Endocrinol Metab*, 16, 183–189.

Baruch, D.I., X. C. Ma, H. B. Singh, X. Bi, B. L. Pasloske et R. J. Howard (1997). Identification of a region of PfEMP1 that mediates adherence of Plasmodium falciparum infected erythrocytes to CD36: conserved function with variant sequence. *Blood*, 90, 3766-3775.

Bennett, B. D., G. P. Solar, J. Q. Yuan, J. Mathias, G. R. Thomas et W. Matthews (1996). A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis. *Curr Biol*, 6, 1170-1180.

Benomar, Y., N. Naour, A. Aubourg, V. Bailleux, A. Gertler, J. Djiane, M. Guerre-Millo et M. Taouis (2006). Insulin and leptin induce Glut4 plasma membrane translocation and glucose uptake in a human neuronal cell line by a phosphatidylinositol 3-kinase- dependent mechanism. *Endocrinology*, 147, 2550-2556.

Berliner, J. A., M. Navab, A. M. Fogelman, J. S. Frank, L. L. Demer, P. A. Edwards, A. D. Watson et A. J. Lusis (1995). Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation*, 91, 2488-2496.

Bi, W., J.M. Deng, Z. Zhang, R. R. Behringer et B. de Crombrugghe (1999). Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet*, 22, 85-89.

Biver, E., F. Chopin, G. Coiffier, T. F. Brentano, B. Bouvard, P. Garnero et B. Cortet (2012). Bone turnover markers for osteoporotic status assessment? A systematic review of their diagnosis value at baseline in osteoporosis. *Joint Bone Spine*, 79, 20-25.

Bodart, V., M. Febbraio, A. Demers, N. McNicoll, P. Pohankova, A. Perreault, T. Sejlitz, E. Escher, R. L. Silverstein, D. Lamontagne et al. (2002). CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart. *Circ Res*, 90, 844-849.

Bodine, P. V. et B. S. Komm (2006). Wnt signaling and osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord*, 7, 33-39.

Bolin, R. B. (1981). Changes in platelet membranes and bouyant density with storage of platelet concentrates at 22 degrees C. *Vox Sang*, 40 Suppl 1, 117-118.

Bone, H. G., M. A. Bolognese, C. K. Yuen, D. L. Kendler, P. D. Miller, Y. C. Yang, L. Grazette, J. San Martin et J. C. Gallagher (2011). Effects of denosumab treatment and discontinuation on bone mineral density and bone turnover markers in postmenopausal women with low bone mass. *J Clin Endocrinol Metab*, 96, 972-980.

Bonen, A., J. J. Luiken et J. F. Glatz (2002). Regulation of fatty acid transport and membrane transporters in health and disease. *Mol Cell Biochem*, 239, 181-192.

Bonewald, L. F. et G. R. Mundy (1990). Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling. *Clin Orthop Relat Res*, 261-276.

Boskey, A. L. (2013). Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. *Bonekey Rep*, 2, 447.

Boskey, A. L., F. H. Wians Jr. et P. V. Hauschka (1985). The effect of osteocalcin on in vitro lipid-induced hydroxyapatite formation and seeded hydroxyapatite growth. *Calcif Tissue Int*, 37, 57-62.

Bottcher, A., U. S. Gaipl, B. G. Furnrohr, M. Herrmann, I. Girkontaite, J. R. Kalden et R. E. Voll (2006). Involvement of phosphatidylserine, alphavbeta3, CD14, CD36, and complement C1q in the phagocytosis of primary necrotic lymphocytes by macrophages. *Arthritis Rheum*, 54, 927-938.

Boudreaux, J. M. et D. A. Towler (1996). Synergistic induction of osteocalcin gene expression: identification of a bipartite element conferring fibroblast growth factor 2 and cyclic AMP responsiveness in the rat osteocalcin promoter. *J Biol Chem*, 271, 7508-7515.

Boullier, A., D. A. Bird, M. K. Chang, E. A. Dennis, P. Friedman, K. Gillotre-Taylor, S. Horkko, W. Palinski, O. Quehenberger, P. Shaw et al. (2001). Scavenger receptors, oxidized LDL, and atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci*, 947, 214-223.

Bovolenta, P., P. Esteve, J. M. Ruiz, E. Cisneros et J. Lopez-Rios (2008). Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J Cell Sci*, 121, 737-746.

Bowers, C. Y. (1998). Growth hormone-releasing peptide (GHRP). Cell Mol Life Sci, 54, 1316-1329.

Bowers, C. Y., F. Momany, G. A. Reynolds, D. Chang, A. Hong et K. Chang (1980). Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro. *Endocrinology*, 106, 663-667.

Bowers, C. Y., F. A. Momany, G. A. Reynolds et A. Hong (1984). On the in vitro and in vivo activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release growth hormone. *Endocrinology*, 114, 1537-1545.

Bowers, C. Y., G. A. Reynolds, D. Chang, A. Hong, K. Chang et F. Momany (1981). A study on the regulation of growth hormone release from the pituitaries of rats in vitro. *Endocrinology*, 108, 1071-1080.

Boyce, B. F. et L. Xing (2007). Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther*, 9 Suppl 1, S1.

Boyce, B. F. et L. Xing (2008). Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*, 34, 139-146.

Boyle, W. J., W. S. Simonet et D. L. Lacey (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423, 337-342.

Brodeur, M. R., L. Brissette, L. Falstrault, V. Luangrath et R. Moreau (2008a). Scavenger receptor of Class B expressed by osteoblastic cells are implicated in the uptake of cholesteryl ester and estradiol from LDL and HDL3. *J Bone Miner Res*, 23, 326–337.

Brodeur, M. R., L. Brissette, L. Falstrault, P. Ouellet et R. Moreau (2008b) Influence of oxidized low-density lipoproteins (LDL) on the viability of osteoblastic cells. *Free Radic Biol Med*, 44, 506-517.

Brodsky, B. et A. V. Persikov (2005). Molecular structure of the collagen triple helix. *Adv Protein Chem*, 70, 301-339.

Brown, J. P., P. D. Delmas, L. Malaval, C. Edouard, M. C. Chapuy et P. J. Meunier (1984). Serum bone Gla-protein: a specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis. *Lancet*, 1, 1091-1093.

Brundert, M., J. Heeren, M. Merkel, A. Carambia, J. Herkel, P. Groitl, T. Dobner, R. Ramakrishnan, K. J. Moore et F. Rinninger (2011). Scavenger receptor CD36 mediates uptake of high density lipoproteins in mice and by cultured cells. *J Lipid Res*, 52, 745-758.

Bucay, N., I. Sarosi, C.R. Dunstan, S. Morony, J. Tarpley, C. Capparelli, S. Scully, H. L. Tan, W. Xu, D. L. Lacey et al. (1998). osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*, 12, 1260-1268.

Burguera, B., L. C. Hofbauer, T. Thomas, F. Gori, G. L. Evans, S. Khosla, B. L. Riggs et R. T. Turner (2001). Leptin reduces ovariectomy-induced bone loss in rats. *Endocrinology*, 142, 3546-3553.

Byers, B. A. et A. J. Garcia (2004). Exogenous Runx2 expression enhances in vitro osteoblastic differentiation and mineralization in primary bone marrow stromal cells. *Tissue Eng*, 10, 1623-1632.

Byers, B. A., G. K. Pavlath, T. J. Murphy, G. Karsenty et A. J. Garcia (2002). Celltype-dependent up-regulation of in vitro mineralization after overexpression of the osteoblast-specific transcription factor Runx2/Cbfal. *J Bone Miner Res*, 17, 1931-1944.

Caetano-Lopes, J., H. Canhao et J. E. Fonseca (2007). Osteoblasts and bone formation. Acta Reumatol Port, 32, 103-110.

Cai, L., Z. Wang, A. Ji, J. M. Meyer et D. R. van der Westhuyzen (2012). Scavenger receptor CD36 expression contributes to adipose tissue inflammation and cell death in diet-induced obesity. *PLoS One*, 7, e36785.

Calvo, D., D. Gomez-Coronado, Y. Suarez, M. A. Lasuncion et M. A. Vega (1998). Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *J Lipid Res*, 39, 777-788.

Caplan, A. I. (2009). Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. J Pathol, 217, 318-324.

Carron, J. A., S. C. Wagstaff, J. A. Gallagher et W. B. Bowler (2000). A CD36binding peptide from thrombospondin-1 can stimulate resorption by osteoclasts in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 270, 1124-1127.

Cerri, P. S. (2005). Osteoblasts engulf apoptotic bodies during alveolar bone formation in the rat maxilla. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 286, 833-840.

Chamberlain, G., J. Fox, B. Ashton et J. Middleton (2007). Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*, 25, 2739-2749.

Chen, K., M. Febbraio, W. Li et R. L. Silverstein (2008). A specific CD36-dependent signaling pathway is required for platelet activation by oxidized low-density lipoprotein. *Circ Res*, 102, 1512-1519.

Chen, M., Y. Yang, E. Braunstein, K. E. Georgeson et C. M. Harmon (2001). Gut expression and regulation of FAT/CD36: possible role in fatty acid transport in rat enterocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 281, E916-923.

Chen, M., Y. K. Yang, T. J. Loux, K. E. Georgeson et C. M. Harmon (2006). The role of hyperglycemia in FAT/CD36 expression and function. *Pediatr Surg Int*, 22, 647-654.

Cheung, L., M. Andersen, C. Gustavsson, J. Odeberg, L. Fernandez-Perez, G. Norstedt et P. Tollet-Egnell (2007). Hormonal and nutritional regulation of alternative CD36 transcripts in rat liver-a role for growth hormone in alternative exon usage. *BMC Mol Biol*, 8, 60.

Christiaens, V., M. Van Hul, H. R. Lijnen et I. Scroyen (2012). CD36 promotes adipocyte differentiation and adipogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1820, 949-956.

Chua, S. C. J., I. K. Koutras, L. Han, S. M. Liu, J. Kay, S. J. Young, W. K. Chung et R. L. Leibel (1997). Fine structure of the murine leptin receptor gene: splice site suppression is required to form two alternatively spliced transcripts. *Genomics*, 45, 264-270.

Cirmanova, V., M. Bayer, L. Starka et K. Zajickova (2008). The effect of leptin on bone: an evolving concept of action. *Physiol Res*, 57 Suppl 1, S143-151.

Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*, 3 Suppl 3, S131-139.

Coburn, C. T., F. F. Knapp Jr., M. Febbraio, A. L. Beets, R. L. Silverstein et N. A. Abumrad (2000). Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. *J Biol Chem*, 275, 32523-32529.

Cohen, M. M. Jr. (2006). The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. *Am J Med Genet A*, 140, 2646-2706.

Collot-Teixeira, S., J. Martin, C. McDermott-Roe, R. Poston et J. L. McGregor (2007). CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*, 75, 468-477.

Compston, J. (2009). Clinical and therapeutic aspects of osteoporosis. *Eur J Radiol*, 71, 388-391.

Connelly, M. A., S. M. Klein, S. Azhar, N. A. Abumrad et D. L. Williams (1999). Comparison of class B scavenger receptors, CD36 and scavenger receptor BI (SR-BI), shows that both receptors mediate high density lipoprotein-cholesteryl ester selective uptake but SR-BI exhibits a unique enhancement of cholesteryl ester uptake. *J Biol Chem*, 274, 41-47.

Coraci, I. S., J. Husemann, J. W. Berman, C. Hulette, J. H. Dufour, G. K. Campanella, A. D. Luster, S. C. Silverstein et J. B. El-Khoury (2002). CD36, a class B scavenger receptor, is expressed on microglia in Alzheimer's disease brains and can mediate production of reactive oxygen species in response to beta-amyloid fibrils. *Am J Pathol*, 160, 101-112.

Cornish, J., K. E. Callon, U. Bava, C. Lin, D. Naot, B. L. Hill, A. B. Grey, N. Broom, D. E. Myers, G. C. Nicholson et al. (2002). Leptin directly regulates bone cell function in vitro and reduces bone fragility in vivo. *J Endocrinol*, 175, 405-415.

Couret, I. (2004). Biologie du remodelage osseux. Médecine Nucléaire - Imagerie fonctionnelle et métabolique, 28, 57-65.

Cupi, M. L., M. Sarra, D. De Nitto, E. Franze, I. Marafini, I. Monteleone, G. Del Vecchio Blanco, O. A. Paoluzi, D. Di Fusco, P. Gentileschi et al. (2014). Defective expression of scavenger receptors in celiac disease mucosa. *PLoS One*, 9, e100980.

Dammerman, M. et J. L. Breslow (1995). Genetic basis of lipoprotein disorders. *Circulation*, 91, 505-512.

Daviet, L. et J. L. McGregor (1997). Le CD36, un récepteur multifonctionnel. *Hématologie*, 3, 132-137.

Dawson, D. W., S. F. Pearce, R. Zhong, R. L. Silverstein, W. A. Frazier et N. P. Bouck (1997). CD36 mediates the In vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *J Cell Biol*, 138, 707-717.

Day, T. F., X. Guo, L. Garrett-Beal et Y. Yang (2005). Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell*, 8, 739-750.

de Lau, W. B., B. Snel et H. C. Clevers (2012). The R-spondin protein family. Genome Biol, 13, 242.

de Oliveira Silva, C., S. Delbosc, C. Arais, L. Monnier, J. P. Cristol et N. Pares-Herbute (2008). Modulation of CD36 protein expression by AGEs and insulin in aortic VSMCs from diabetic and non-diabetic rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 18, 23-30.

Deghenghi, R. (1997). The development of 'impervious peptides' as growth hormone secretagogues. *Acta Paediatr Suppl*, 423, 85-87.

Delaisse, J. M. (2014). The reversal phase of the bone-remodeling cycle: cellular prerequisites for coupling resorption and formation. *Bonekey Rep*, 3, 561.

Delmas, P. D., R. Eastell, P. Garnero, M. J. Seibel et J. Stepan (2000). The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. Committee of scientific advisors of the international osteoporosis foundation. *Osteoporos Int*, 11 Suppl 6, S2-17.

Demers, A., N. McNicoll, M. Febbraio, M. Servant, S. Marleau, R. Silverstein et H. Ong (2004). Identification of the growth hormone-releasing peptide binding site in CD36: a photoaffinity cross-linking study. *Biochem J*, 382, 417-424.

Demers, A., A. Rodrigue-Way et A. Tremblay (2008). Hexarelin signaling to PPARgamma in metabolic diseases. *PPAR Res*, 2008, 364784.

Demir, B., A. Haberal, P. Geyik, B. Baskan, E. Ozturkoglu, O. Karacay et S. Deveci (2008). Identification of the risk factors for osteoporosis among postmenopausal women. *Maturitas*, 60, 253-256.

Dhariwala, M. O. et D. M. Anderson (2014). Bacterial programming of host responses: coordination between type I interferon and cell death. *Front Microbiol*, 5, 545.

Ding, M., Y. Lu, S. Abbassi, F. Li, X. Li, Y. Song, V. Geoffroy, H. J. Im et Q. Zheng (2012). Targeting Runx2 expression in hypertrophic chondrocytes impairs endochondral ossification during early skeletal development. *J Cell Physiol*, 227, 3446–3456.

Doblare, M., J. M. Garcia et M. J. Gomez (2004). Modelling bone tissue fracture and healing: a review. *Eng Fract Mech*, 71, 1809–1840.

Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop et E. Horwitz (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, 315-317.

Dominiczak, M. H. et M. J. Caslake (2011). Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications. *Ann Clin Biochem*, 48, 498-515.

Drickamer, K. (1988). Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J Biol Chem*, 263, 9557-9560.

Drover, V. A., D. V. Nguyen, C. C. Bastie, Y. F. Darlington, N. A. Abumrad, J. E. Pessin, E. London, D. Sahoo et M. C. Phillips (2008). CD36 Mediates Both Cellular Uptake of Very Long Chain Fatty Acids and Their Intestinal Absorption in Mice. *J Biol Chem*, 283, 13108–13115.

Ducy, P., M. Amling, S. Takeda, M. Priemel, A.F. Schilling, F.T. Beil, J. Shen, C. Vinson, J. M. Rueger et G. Karsenty (2000a). Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*, 100, 197-207.

Ducy, P., T. Schinke et G. Karsenty (2000b). The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*, 289, 1501-1504.

Ducy, P., R. Zhang, V. Geoffroy, A.L. Ridall et G. Karsenty (1997). Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 89, 747-754.

El-Yassimi, A., A. Hichami, P. Besnard et N. A. Khan (2008). Linoleic acid induces calcium signaling, Src kinase phosphorylation, and neurotransmitter release in mouse CD36-positive gustatory cells. *J Biol Chem*, 283, 12949-12959.

El Khoury, J. B., K. J. Moore, T. K. Means, J. Leung, K. Terada, M. Toft, M. W. Freeman et A. D. Luster (2003). CD36 mediates the innate host response to betaamyloid. *J Exp Med*, 197, 1657-1666.

Elbrecht, A., Y. Chen, C. A. Cullinan, N. Hayes, M. Leibowitz, D. E. Moller et J. Berger (1996). Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors gamma 1 and gamma 2. *Biochem Biophys Res Commun*, 224, 431-437.

Elliott, M. R. et K. S. Ravichandran (2010). Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *J Cell Biol*, 189, 1059-1070.

Elrod, H. A. et S. Y. Sun (2008). PPARgamma and apoptosis in cancer. *PPAR Res*, 2008, 704165.

Endemann, G., L. W. Stanton, K. S. Madden, C. M. Bryant, R. T. White et A. A. Protter (1993). CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem*, 268, 11811-11816.

Epstein, E. H. et N. H. Munderloh (1978). Human Skin Collagen. Presence of type I and type III at all levels of the dermis. *J Biol Chem*, 253, 1336-1337.

Erben, R. G. (1997). Embedding of bone samples in methylmethacrylate: an improved method suitable for bone histomorphometry, histochemistry, and immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*, 45, 307-313.

Erdman, L. K., G. Cosio, A. J. Helmers, D. C. Gowda, S. Grinstein et K. C. Kain (2009). CD36 and TLR interactions in inflammation and phagocytosis: implications for malaria. *J Immunol*, 183, 6452-6459.

Eriksen, E. F. (2010). Cellular mechanisms of bone remodeling. Rev Endocr Metab Disord, 11, 219-227.

Esterbauer, H., J. Gebicki, H. Puhl et G. Jurgens (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med*, 13, 341-390.

Etheridge, S. L., G. J. Spencer, D. J. Heath et P. G. Genever (2004). Expression profiling and functional analysis of wnt signaling mechanisms in mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 22, 849-860.

Eto, M., H. Yoshikawa, H. Fujimura, I. Naba, H. Sumi-Akamaru, S. Takayasu, H. Itabe et S. Sakoda (2003). The role of CD36 in peripheral nerve remyelination after crush injury. *Eur J Neurosci*, 17, 2659-2666.

Fadok, V. A., M. L. Warner, D. L. Bratton et P. M. Henson (1998). CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor ($\alpha_v\beta_3$). *J Immunol*, 161, 6250-6257.

Faje, A. et A. Klibanski (2012). Body composition and skeletal health: too heavy? Too thin? *Curr Osteoporos Rep*, 10, 208-216.

Fakhry, M., E. Hamade, B. Badran, R. Buchet et D. Magne (2013). Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. *World J Stem Cells*, 5, 136-148.

Farhangkhoee, H., Z. A. Khan, Y. Barbin et S. Chakrabarti (2005). Glucose-induced up-regulation of CD36 mediates oxidative stress and microvascular endothelial cell dysfunction. *Diabetologia*, 48, 1401-1410.

Febbraio, M., N. A. Abumrad, D. P. Hajjar, K. Sharma, W. Cheng, S. F. Pearce et R. L. Silverstein (1999). A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J Biol Chem*, 274, 19055-19062.

Febbraio, M., D. P. Hajjar et R. L. Silverstein (2001). CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest*, 108, 785-791.

Febbraio, M., E. A. Podrez, J. D. Smith, D. P. Hajjar, S. L. Hazen, H. F. Hoff, K. Sharma et R. L. Silverstein (2000). Targeted disruption of the Class B scavenger receptor, CD36, protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest*, 105, 1049-1056.

Feng, J., J. Han, S. F. Pearce, R. L. Silverstein, A. M. J. Gotto, D. P. Hajjar et A. C. Nicholson (2000). Induction of CD36 expression by oxidized LDL and IL-4 by a common signaling pathway dependent on protein kinase C and PPAR-gamma. *J Lipid Res*, 41, 688-696.

Fernandez-Ruiz, E., A. L. Armesilla, F. Sanchez-Madrid et M. A. Vega (1993). Gene encoding the collagen type I and thrombospondin receptor CD36 is located on chromosome 7q11.2. *Genomics*, 17, 759-761.

Ferracini, M., F. J. Rios, M. Pecenin et S. Jancar (2013). Clearance of apoptotic cells by macrophages induces regulatory phenotype and involves stimulation of CD36 and platelet-activating factor receptor. *Mediators Inflamm*, 2013, 950273.

Ferrari, S. L., S. Deutsch et S. E. Antonarakis (2005). Pathogenic mutations and polymorphisms in the lipoprotein receptor-related protein 5 reveal a new biological pathway for the control of bone mass. *Curr Opin Lipidol*, 16, 207-214.

Finck, B.N. et R.W. Johnson (2000) Tumor necrosis factor (TNF)-alpha induces leptin production through the p55 TNF receptor. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 278, R537-543.

Fluiter, K. et T. J. van Berkel (1997). Scavenger receptor B1 (SR-B1) substrates inhibit the selective uptake of high-density-lipoprotein cholesteryl esters by rat parenchymal liver cells. *Biochem J*, 326, 515-519.

Fong, L. G., S. Parthasarathy, J. L. Witztum et D. Steinberg (1987). Nonenzymatic oxidative cleavage of peptide bonds in apoprotein B-100. *J Lipid Res*, 28, 1466-1477.

Fratzl, P., H. S. Gupta, E. P. Paschalisb et P. Roschger (2004). Structure and mechanical quality of the collagen-mineral nano-composite in bone. *J Mater Chem*, 14, 2115-2123.

Freeman, M., J. Ashkenas, D. J. Rees, D. M. Kingsley, N. G. Copeland, N. A. Jenkins et M. Krieger (1990). An ancient, highly conserved family of cysteine-rich protein domains revealed by cloning type I and type II murine macrophage scavenger receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 8810-8814.

Friedenstein, A. J., J. F. Gorskaja et N. N. Kulagina (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, 4, 267-274.

Friedman, J. M. et J. L. Halaas (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395, 763-770.

Frohlich, J. et A. Al-Sarraf (2013). Cardiovascular risk and atherosclerosis prevention. *Cardiovasc Pathol*, 22, 16–18.

Frost, H. M. (2001). Cybernetic aspects of bone modeling and remodeling, with special reference to osteoporosis and whole-bone strength. *Am J Hum Biol*, 13, 235-248.

Fruhbeck, G. (2006). Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J*, 393, 7-20.

Galvin, K. E., H. Ye, D. J. Erstad, R. Feddersen et C. Wetmore (2008). Gli1 induces G2/M arrest and apoptosis in hippocampal but not tumor-derived neural stem cells. *Stem cells*, 26, 1027-1036.

Gaur, T., C. J. Lengner, H. Hovhannisyan, R. A. Bhat, P. V. Bodine, B. S. Komm, A. Javed, A. J. van Wijnen, J. L. Stein, G. S. Stein et al. (2005). Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. J Biol Chem, 280, 33132-33140.

Gehron Robey, P. (1989). The biochemistry of bone. Endocrinol Metab Clin North Am, 18, 858-902.

Gelse, K., E. Poschl et T. Aigner (2003). Collagens-structure, function, and biosynthesis. Adv Drug Deliv Rev, 55, 1531-1546.

Geourjon, C., C. Orelle, E. Steinfels, C. Blanchet, G. Deleage, A. Di Pietro et J. M. Jault (2001). A common mechanism for ATP hydrolysis in ABC transporter and helicase superfamilies. *Trends Biochem Sci*, 26, 539-544.

Gerber, H. P., Vu T. H., RyanA. M., Kowalski J., Werb Z., Ferrara N. (1999). VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med*, 5, 623-628.

Ghosh, A., W. Li, M. Febbraio, R. G. Espinola, K. R. McCrae, E. Cockrell et R. L. Silverstein (2008). Platelet CD36 mediates interactions with endothelial cell-derived microparticles and contributes to thrombosis in mice. *J Clin Invest*, 118, 1934-1943.

Gilley, J., P.J. Coffer et J. Ham (2003). FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *J Cell Biol*, 162, 613–622.

Gillot, I., C. Jehl-Pietri, P. Gounon, S. Luquet, M. Rassoulzadegan, P. Grimaldi et F. Vidal (2005). Germ cells and fatty acids induce translocation of CD36 scavenger receptor to the plasma membrane of Sertoli cells. *J Cell Sci*, 118, 3027-3035.

Giner, M., M. J. Montoya, M. A. Vázquez, M. J. Rios, R. Moruno, M. J. Miranda et R. Pérez-Cano (2008). Modifying RANKL/OPG mRNA expression in differentiating and growing human primary osteoblasts. *Horm Metab Res*, 40, 869-874.

Glantschnig, H., R. A. Hampton, P. Lu, J. Z. Zhao, S. Vitelli, L. Huang, P. Haytko, T. Cusick, C. Ireland, S. W. Jarantow et al. (2010). Generation and selection of novel fully human monoclonal antibodies that neutralize Dickkopf-1 (DKK1) inhibitory function in vitro and increase bone mass in vivo. *J Biol Chem*, 285, 40135-40147.

Glass, D. A., 2nd, P. Bialek, J. D. Ahn, M. Starbuck, M. S. Patel, H. Clevers, M. M. Taketo, F. Long, A. P. McMahon, R. A. Lang et al. (2005). Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell*, 8, 751-764.

Goltzman, D. (2011). LRP5, serotonin, and bone: complexity, contradictions, and conundrums. *J Bone Miner Res*, 26, 1997-2001.

Good, D. J., P. J. Polverini, F. Rastinejad, M. M. Le Beau, R. S. Lemons, W. A. Frazier et N. P. Bouck (1990). A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 6624-6628.

Gordeladze, J. O., C. A. Drevon, U. Syversen et J. E. Reseland (2002). Leptin stimulates human osteoblastic cell proliferation, de novo collagen synthesis, and mineralization: Impact on differentiation markers, apoptosis, and osteoclastic signaling. *J Cell Biochem*, 85, 825-836.

Gordon, M. D. et R. Nusse (2006). Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem*, 281, 22429-22433.

Goudriaan, J. R., V. E. Dahlmans, B. Teusink, D. M. Ouwens, M. Febbraio, J. A. Maassen, J. A. Romijn, L. M. Havekes et P. J. Voshol (2003). CD36 deficiency increases insulin sensitivity in muscle, but induces insulin resistance in the liver in mice. *J Lipid Res*, 44, 2270-2277.

Goudriaan, J. R., M. A. den Boer, P. C. Rensen, M. Febbraio, F. Kuipers, J. A. Romijn, L. M. Havekes et P. J. Voshol (2005). CD36 deficiency in mice impairs lipoprotein lipase-mediated triglyceride clearance. *J Lipid Res*, 46, 2175-2181.

Greenberg, M. E., X. M. Li, B. G. Gugiu, X. Gu, J. Qin, R. G. Salomon et S. L. Hazen (2008). The lipid whisker model of the structure of oxidized cell membranes. *J Biol Chem*, 283, 2385-2396.

Greenberg, M. E., M. Sun, R. Zhang, M. Febbraio, R. Silverstein et S. L. Hazen (2006). Oxidized phosphatidylserine-CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells. *J Exp Med*, 203, 2613-2625.

Griffin, E., A. Re, N. Hamel, C. Fu, H. Bush, T. McCaffrey et A. S. Asch (2001). A link between diabetes and atherosclerosis: Glucose regulates expression of CD36 at the level of translation. *Nat Med*, 7, 840-846.

Gronthos, S., M. Mankani, J. Brahim, P. G. Robey et S. Shi (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 13625-13630.

Gruarin, P., R. F. Thorne, D. J. Dorahy, G. F. Burns, R. Sitia et M. Alessio (2000). CD36 is a ditopic glycoprotein with the N-terminal domain implicated in intracellular transport. *Biochem Biophys Res Commun*, 275, 446-454.

Guglielmi, G., S. Muscarella et A. Bazzocchi (2011). Integrated imaging approach to osteoporosis: state-of-the-art review and update. *Radiographics*, 31, 1343-1364.

Guthmann, F., R. Haupt, A. C. Looman, F. Spener et B. Rustow (1999). Fatty acid translocase/CD36 mediates the uptake of palmitate by type II pneumocytes. *Am J Physiol*, 277, L191-196.

Hajri, T., A. M. Hall, D. R. Jensen, T. A. Pietka, V. A. Drover, H. Tao, R. Eckel et N. A. Abumrad (2007). CD36-facilitated fatty acid uptake inhibits leptin production and signaling in adipose tissue. *Diabetes*, 56, 1872-1880.

Halleen, J. M., S. L. Alatalo, H. Suominen, S. Cheng, A. J. Janckila et H. K. Vaananen (2000). Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. *J Bone Miner Res*, 15, 1337-1345.

Hamrick, M. W., M. A. Della-Fera, Y. H. Choi, C. Pennington, D. Hartzell et C. A. Baile (2005). Leptin treatment induces loss of bone marrow adipocytes and increases bone formation in leptin-deficient ob/ob mice. *J Bone Miner Res*, 20, 994-1001.

Hamrick, M. W., C. Pennington, D. Newton, D. Xie et C. Isales (2004). Leptin deficiency produces contrasting phenotypes in bones of the limb and spine. *Bone*, 34, 376-383.

Han, J., D. P. Hajjar, J. M. Tauras, J. Feng, A. M. Gotto Jr. et A. C. Nicholson (2000). Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and TGF-beta2 decrease expression of CD36, the type B scavenger receptor, through mitogen-activated
protein kinase phosphorylation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Biol Chem*, 275, 1241-1246.

Han, S. et N. Sidell (2002). Peroxisome-proliferator-activated-receptor gamma (PPARgamma) independent induction of CD36 in THP-1 monocytes by retinoic acid. *Immunology*, 106, 53-59.

Han, X., S. Kitamoto, Q. Lian et W. A. Boisvert (2009). Interleukin-10 facilitates both cholesterol uptake and efflux in macrophages. *J Biol Chem*, 284, 32950-32958.

Hankenson, K. D., M. T. Sweetwyne, H. Shitaye et K. L. Posey (2010). Thrombospondins and novel TSR-containing proteins, R-spondins, regulate bone formation and remodeling. *Curr Osteoporos Rep*, 8, 68-76.

Haque, W. A., I. Shimomura, Y. Matsuzawa et A. Garg (2002). Serum adiponectin and leptin levels in patients with lipodystrophies. *J Clin Endocrinol Metab*, 87, 2395.

Harada, S. et G. A. Rodan (2003). Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*, 423, 349-355.

Hardwick, S. J., L. Hegyi et K. Clare (1996). Apoptosis in human monocytemacrophages exposed to oxidized low density lipoprotein. *J Pathol*, 179, 294-302.

Harmon, C. M. et N. A. Abumrad (1993). Binding of sulfosuccinimidyl fatty acids to adipocyte membrane proteins: isolation and amino-terminal sequence of an 88-kD protein implicated in transport of long-chain fatty acids. *J Membr Biol*, 133, 43-49.

Havel, R. J. (1987). Lipid transport function of lipoproteins in blood plasma. Am J Physiol, 253, E1-5.

Heinemann, D. E., C. Lohmann, H. Siggelkow, F. Alves, I. Engel et G. Koster (2000). Human osteoblast-like cells phagocytose metal particles and express the macrophage marker CD68 in vitro. *J Bone Joint Surg Br*, 82, 283-289.

Helming, L., J. Winter et S. Gordon (2009). The scavenger receptor CD36 plays a role in cytokine-induced macrophage fusion. *J Cell Sci*, 122, 453-459.

Hill, T. P., D. Spater, M. M. Taketo, W. Birchmeier et C. Hartmann (2005). Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell*, 8, 727-738. Hirano, K., T. Kuwasako, Y. Nakagawa-Toyama, M. Janabi, S. Yamashita et Y. Matsuzawa (2003). Pathophysiology of human genetic CD36 deficiency. *Trends Cardiovasc Med*, 13, 136-141.

Hjortnaes, J., J. Butcher, J. L. Figueiredo, M. Riccio, R. H. Kohler, K. M. Kozloff, R. Weissleder et E. Aikawa (2010). Arterial and aortic valve calcification inversely correlates with osteoporotic bone remodelling: a role for inflammation. *Eur Heart J*, 31, 1975-1984.

Ho, K. K., S. S. Myatt et E. W. Lam (2008). Many forks in the path: cycling with FoxO. *Oncogene*, 27, 2300-2311.

Hock, J. M., M. Centrella et E. Canalis (1988). Insulin-like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology*, 122, 254-260.

Hodsman, A. B., D. C. Bauer, D. W. Dempster, L. Dian, D. A. Hanley, S. T. Harris, D. L. Kendler, M. R. McClung, P. D. Miller, W. P. Olszynski et al. (2005). Parathyroid hormone and teriparatide for the treatment of osteoporosis: a review of the evidence and suggested guidelines for its use. *Endocr Rev*, 26, 688-703.

Holloway, W. R., F. M. Collier, C. J. Aitken, D. E. Myers, J. M. Hodge, M. Malakellis, T. J. Gough, G. R. Collier et G. C. Nicholson (2002). Leptin inhibits osteoclast generation. *J Bone Miner Res*, 17, 200-209.

Hoosdally, S. J., E. J. Andress, C. Wooding, C. A. Martin et K. J. Linton (2009). The human scavenger receptor CD36: glycosylation status and its role in trafficking and function. *J Biol Chem*, 284, 16277-16288.

Horiuchi, S., Y. Sakamoto et M. Sakai (2003). Scavenger receptors for oxidized and glycated proteins. *Amino Acids*, 25, 283-292.

Hospattankar, A. V., S. W. Law, K. Lackner et H. B. Brewer Jr. (1986). Identification of low density lipoprotein receptor binding domains of human apolipoprotein B-100: a proposed consensus LDL receptor binding sequence of apoB-100. *Biochem Biophys Res Commun*, 139, 1078-1085.

Houssier, M., W. Raoul, S. Lavalette, N. Keller, X. Guillonneau, B. Baragatti, L. Jonet, J-C. Jeanny, F. Behar-Cohen, F. Coceani et al. (2008). CD36 Deficiency Leads to Choroidal Involution via COX2 Down-Regulation in Rodents. *PLoS Medecine*, 5:e39, 323-330.

Hu, H., M. J. Hilton, X. Tu, K. Yu, D. M. Ornitz et F. Long (2005). Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development*, 132, 49-60.

Huang, J. T., J. S. Welch, M. Ricote, C. J. Binder, T. M. Willson, C. Kelly, J. L. Witztum, C. D. Funk, D. Conrad et C. K. Glass (1999). Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature*, 400, 378-382.

Hughes-Fulford, M. et C. F. Li (2011). The role of FGF-2 and BMP-2 in regulation of gene induction, cell proliferation and mineralization. *J Orthop Surg Res*, 6, 8.

Huh, H.Y., S. K. Lo, L. M. Yesner et R. L. Silverstein (1995). CD36 induction on human monocytes upon adhesion to tumor necrosis factor-activated endothelial cells. *J Biol Chem*, 270, 6267-6271.

Huh, H. Y., S. F. Pearce, L. M. Yesner, J. L. Schindler et R. L. Silverstein (1996). Regulated expression of CD36 during monocyte-to-macrophage differentiation: potential role of CD36 in foam cell formation. *Blood*, 87, 2020-2028.

Hunter, G. K., P. V. Hauschka, A. R. Poole, L. C. Rosenberg et H. A. Goldberg (1996). Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J*, 317, 59-64.

Hunziker, E. B., R. K. Schenk et L. M. Cruz-Orive (1987). Quantitation of chondrocyte performance in growth-plate cartilage during longitudinal bone growth. *J Bone Joint Surg Am*, 69, 162-173.

Husemann, J., J. D. Loike, R. Anankov, M. Febbraio et S. C. Silverstein (2002). Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: their role on microglia and other cells of the nervous system. *Glia*, 40, 195-205.

Ibrahim, Z. A., C. L. Armour, S. Phipps et M. B. Sukkar (2013). RAGE and TLRs: relatives, friends or neighbours? *Mol Immunol*, 56, 739-744.

Ibrahimi, A., A. Bonen, W. D. Blinn, T. Hajri, X. Li, K. Zhong, R. Cameron et N. A. Abumrad (1999). Muscle-specific overexpression of FAT/CD36 enhances fatty acid oxidation by contracting muscle, reduces plasma triglycerides and fatty acids, and increases plasma glucose and insulin. *J Biol Chem*, 274, 26761-26766.

Ibrahimi, A. (2003). Fatty acid transport: a physiological perspective. In: Medeiros-Neto G., Halpern A., Bouchard C., editors. Progress in Obesity Research : 9. Monterouge: John Libbey Eurotext Ltd. pp. 1065. Ikeda, H., T. Mitani, M. Ohnuma, H. Haga, S. Ohtzuka, T. Kato, T. Nakase et S. Sekiguchi (1989). A new platelet-specific antigen, Naka, involved in the refractoriness of HLA-matched platelet transfusion. *Vox Sang*, 57, 213-217.

Imai, M., T. Tanaka, T. Kintaka, T. Ikemoto, A. Shimizu et Y. Kitaura (2002). Genomic heterogeneity of type II CD36 deficiency. *Clin Chim Acta*, 321, 97-106.

Inoue, K. et Y. Imai (2014). Identification of novel transcription factors in osteoclast differentiation using genome-wide analysis of open chromatin determined by DNase-seq. *J Bone Miner Res*, 29, 1823-1832.

Ishida, M. et S. Amano (2004). Osteocalcin fragment in bone matrix enhances osteoclast maturation at a late stage of osteoclast differentiation. *J Bone Miner Metab*, 22, 415-429.

Iyer, S., E. Ambrogini, S. M. Bartell, L. Han, P. K. Roberson de Cabo, R. L. Jilka, R. S. Weinstein, C. A. O'Brien, S. C. Manolagas et M. Almeida (2013). FOXOs attenuate bone formation by suppressing Wnt signaling. *J Clin Invest*, 123, 3409-3419.

James, A. W., P. Leucht, B. Levi, A. L. Carre, Y. Xu, J. A. Helms et M. T. Longaker (2010). Sonic Hedgehog influences the balance of osteogenesis and adipogenesis in mouse adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng Part A*, 16, 2605-2616.

James, A. W. (2013). Review of signaling pathways governing MSC osteogenic and adipogenic differentiation. *Scientifica (Cairo)*, 2013, 684736.

Janabi, M., S. Yamashita, K. Hirano, N. Sakai, H. Hiraoka, K. Matsumoto, Z. Zhang, S. Nozaki et Y. Matsuzawa (2000). Oxidized LDL-induced NF-kappa B activation and subsequent expression of proinflammatory genes are defective in monocytederived macrophages from CD36-deficient patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20, 1953-1960.

Jedidi, I., M. Couturier, P. Therond, M. Gardes-Albert, A. Legrand, R. Barouki, D. Bonnefont-Rousselot et M. Aggerbeck (2006). Cholesteryl ester hydroperoxides increase macrophage CD36 gene expression via PPARalpha. *Biochem Biophys Res Commun*, 351, 733-738.

Jeppesen, J., P. H. Albers, A. J. Rose, J. B. Birk, P. Schjerling, N. Dzamko, G. R. Steinberg et B. Kiens (2011). Contraction-induced skeletal muscle FAT/CD36 trafficking and FA uptake is AMPK independent. *J Lipid Res*, 52, 699-711.

Jepsen, K. J., M. J. Silva, D. Vashishth, X. E. Guo et M. C. van der Meulen (2015). Establishing biomechanical mechanisms in mouse models: practical guidelines for systematically evaluating phenotypic changes in the diaphyses of long bones. *J Bone Miner Res*, 6, 951-966.

Jimenez, B., O. V. Volpert, S. E. Crawford, M. Febbraio, R. L. Silverstein et N. Bouck (2000). Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat Med*, 6, 41-48.

Johansson, I., S. Destefanis, N. D. Aberg, M. A. Aberg, K. Blomgren, C. Zhu, C. Ghe, R. Granata, E. Ghigo, G. Muccioli et al. (2008). Proliferative and protective effects of growth hormone secretagogues on adult rat hippocampal progenitor cells. *Endocrinology*, 149, 2191-2199.

Juhlin, L. (1989). Expression of CD36 (OKM5) antigen on epidermal cells in normal and diseased skin. *Acta Derm Venerol*, 69, 403-406.

Kalra, S.P., M. G. Dube et U. T. Iwaniec (2009). Leptin increases osteoblast-specific osteocalcin release through a hypothalamic relay. *Peptides*, 30, 967-973.

Karsenty, G. et E. F. Wagner (2002). Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell*, 2, 389-406.

Karsenty, G. (2006). Convergence between bone and energy homeostases: leptin regulation of bone mass. *Cell Metab*, 4, 341-348.

Kashiwagi, H., Y. Tomiyama, S. Honda, S. Kosugi, M. Shiraga, N. Nagao, S. Sekiguchi, Y. Kanayama, Y. Kurata et Y. Matsuzawa (1995). Molecular basis of CD36 deficiency. Evidence that a 478C-->T substitution (proline90-->serine) in CD36 cDNA accounts for CD36 deficiency. *J Clin Invest*, 95, 1040-1046.

Kashiwagi, H., Y. Tomiyama, S. Kosugi, M. Shiraga, R. H. Lipsky, Y. Kanayama, Y. Kurata et Y. Matsuzawa (1994). Identification of molecular defects in a subject with type I CD36 deficiency. *Blood*, 83, 3545-3552.

Kashiwagi, H., Y. Tomiyama, S. Nozaki, T. Kiyoi, S. Tadokoro, K. Matsumoto, S. Honda, S. Kosugi, Y. Kurata et Y. Matsuzawa (2001). Analyses of genetic abnormalities in type I CD36 deficiency in Japan: identification and cell biological characterization of two novel mutations that cause CD36 deficiency in man. *Hum Genet*, 108, 459-466.

Kataoka, H., N. Kume et S. Miyamoto (2001). Oxidized LDL modulates BaxlBcl-2 through the lectin-like Ox-LDL receptor-1 in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21, 955-960.

Kato, M., M.S. Patel, R. Levasseur, I. Lobov, B. H. Chang, D.A. Glass 2nd, C. Hartmann, L. Li, T. H. Hwang, C. F. Brayton et al. (2002). Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol*, 157, 303-314.

Kavanagh, I. C., C. E. Symes, P. Renaudin, E. Nova, M. D. Mesa, G. Boukouvalas, D. S. Leake et P. Yaqoob (2003). Degree of oxidation of low density lipoprotein affects expression of CD36 and PPARgamma, but not cytokine production, by human monocyte-macrophages. *Atherosclerosis*, 168, 271-282.

Kawaguchi, H., T. Akune, M. Yamaguchi, S. Ohba, N. Ogata, U. I. Chung, N. Kubota, Y. Terauchi, T. Kadowaki et K. Nakamura (2005). Distinct effects of PPARgamma insufficiency on bone marrow cells, osteoblasts, and osteoclastic cells. *J Bone Miner Metab*, 23, 275-279.

Kawano, Y. et R. Kypta (2003). Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci*, 116, 2627-2634.

Kayal, R.A., M. Siqueira, J. Alblowi, J. McLean, N. Krothapalli, D. Faibish, T.A. Einhorn, L.C. Gerstenfeld et D.T. Graves (2010). TNF-alpha mediates diabetesenhanced chondrocyte apoptosis during fracture healing and stimulates chondrocyte apoptosis through FOXO1. *J Bone Miner Res*, 25, 1604-1615.

Kazanskaya, O., A. Glinka, I. del Barco Barrantes, P. Stannek, C. Niehrs et W. Wu (2004). R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for Xenopus myogenesis. *Dev Cell*, 7, 525-534.

Keene, D. R., L. Y. Sakai et R. E Burgeson (1991). Human bone contains type III collagen, type VI collagen, and fibrillin: type III collagen is present on specific fibers that may mediate attachment of tendons, ligaments, and periosteum to calcified bone cortex. *J Histochem Cytochem*, 39, 59-69.

Kennell, J. A. et O. A. MacDougald (2005). Wnt signaling inhibits adipogenesis through beta-catenin-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem*, 280, 24004-24010.

Kersten, S. (2014). Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochem Biophys* Acta, 1841, 919-933.

Kevorkova, O., C. Martineau, L. Martin-Falstrault, J. Sanchez-Dardon, L. Brissette et R. Moreau (2013). Low-bone-mass phenotype of deficient mice for the cluster of differentiation 36 (CD36). *PLoS One*, 8, e77701.

Kim, W., M. Kim et E. H. Jho (2013). Wnt/beta-catenin signalling: from plasma membrane to nucleus. *Biochem J*, 450, 9-21.

Kishida, Y., M. Hirao, N. Tamai, A. Nampei, T. Fujimoto, T. Nakase, N. Shimizu, H. Yoshikawa et A. Myoui (2005). Leptin regulates chondrocyte differentiation and matrix maturation during endochondral ossification. *Bone*, 37, 607-621.

Klein, B.Y., N. Rojansky, A. Ben-Yehuda, I. Abou-Atta, S. Abedat et G. Friedman (2003). Cell death in cultured human SaoS2 osteoblasts exposed to low-density lipoprotein. *J Cell Biochem*, 90, 42-58.

Kliewer, S. A., B. M. Forman, B. Blumberg, E. S. Ong, U. Borgmeyer, D. J. Mangelsdorf, K. Umesono et R. M. Evans (1994). Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 7355-7359.

Knowles, D. M. 2nd, B. Tolidjian, C. Marboe, V. D'Agati, M. Grimes et L. Chess (1984). Monoclonal anti-human monocyte antibodies OKM1 and OKM5 possess distinctive tissue distributions including differential reactivity with vascular endothelium. *J Immunol*, 132, 2170-2173.

Kodama, T., M. Freeman, L. Rohrer, J. Zabrecky, P. Matsudaira et M. Krieger (1990). Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagenlike coiled coils. *Nature*, 343, 531-535.

Komori, T. (2010). Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res*, 339, 189-195.

Komori, T., H. Yagi, S. Nomura, A. Yamaguchi, K. Sasaki, K. Deguchi, Y. Shimizu, R. T. Bronson, Y. H. Gao, M. Inada et al. (1997). Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, 89, 755-764.

Kong, Y.Y., H. Yoshida, I. Sarosi, H.L. Tan, E. Timms, C. Capparelli, S. Morony, A.J. Oliveira-dos-Santos, G. Van, A. Itie et al. (1999). OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*, 397, 315-323.

Konig, H., P. Pfisterer, L. M. Corcoran et T. Wirth (1995). Identification of CD36 as the first gene dependent on the B-cell differentiation factor Oct-2. *Genes Dev*, 9, 1598-1607.

Konopleva, M., A. Mikhail, Z. Estrov, S. Zhao, D. Harris, G. Sanchez-Williams, S. M. Kornblau, J. Dong, K. O. Kliche, S. Jiang et al. (1999). Expression and function of leptin receptor isoforms in myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes: proliferative and anti-apoptotic activities. *Blood*, 93, 1668-1676.

Konstantinidis, D., K. Paletas, G. Koliakos et M. Kaloyianni (2009). Signaling components involved in leptin-induced amplification of the atherosclerosis-related properties of human monocytes. *J Vasc Res*, 46, 199-208.

Kramer, I., G. G. Loots, A. Studer, H. Keller et M. Kneissel (2010). Parathyroid hormone (PTH)-induced bone gain is blunted in SOST overexpressing and deficient mice. *J Bone Miner Res*, 25, 178-189.

Krieger, M. (1997). The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense. *Curr Opin Lipidol*, 8, 275-280.

Krishnan, V., H. U. Bryant et O. A. Macdougald (2006). Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest*, 116, 1202-1209.

Kristiansen, M., J. H. Graversen, C. Jacobsen, O. Sonne, H. J. Hoffman, S. K. Law et S. K. Moestrup (2001). Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*, 409, 198-201.

Kronenberg, H. M. (2003). Developmental regulation of the growth plate. *Nature*, 423, 332-336.

Kronke, G., S. Uderhardt, K. A. Kim, M. Stock, C. Scholtysek, M. M. Zaiss, C. Surmann-Schmitt, J. Luther, J. Katzenbeisser, J. P. David et al. (2010). R-spondin 1 protects against inflammatory bone damage during murine arthritis by modulating the Wnt pathway. *Arthritis Rheum*, 62, 2303-2312.

Kubota, N., Y. Terauchi, H. Miki, H. Tamemoto, T. Yamauchi, K. Komeda, S. Satoh, R. Nakano, C. Ishii, T. Sugiyama et al. (1999). PPAR gamma mediates high-fat dietinduced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell*, 4, 597-609.

Kuchibhotla, S., D. Vanegas, D. J. Kennedy, E. Guy, G. Nimako, R. E. Morton et M. Febbraio (2008). Absence of CD36 protects against atherosclerosis in ApoE knockout mice with no additional protection provided by absence of scavenger receptor A *I/II. Cardiovasc Res*, 78, 185-196. Kuijpers, M. J., S. de Witt, R. Nergiz-Unal, R. van Kruchten, S. J. Korporaal, P.Verhamme, M. Febbraio, M. Tjwa, P.J. Voshol, M.F. Hoylaerts et al. (2014). Supporting roles of platelet thrombospondin-1 and CD36 in thrombus formation on collagen. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34, 1187-1192.

Kume, K., K. Satomura, S. Nishisho, E. Kitaoka, K. Yamanouchi, S. Tobiume et M. Nagayama (2002). Potential role of leptin in endochondral ossification. *J Histochem Cytochem*, 50, 159-169.

Kushiro, T., F. Saito, J. Kusama, H. Takahashi, T. Imazeki, S. Tani, S. Kikuchi, S. Imai, K. Matsudaira, I. Watanabe et al. (2005). Takotsubo-shaped cardiomyopathy with type I CD36 deficiency. *Heart Vessels*, 20, 123-125.

Lacativa, P. G. et M. L. Farias (2010). Osteoporosis and inflammation. Arq Bras Endocrinol Metabol, 54, 123-132.

Lane, N. E. (2006). Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis. Am J Obstet Gynecol, 194, S3-11.

Laugerette, F., P. Passilly-Degrace, B. Patris, I. Niot, M. Febbraio, J. P. Montmayeur et P. Besnard (2005). CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J Clin Invest*, 115, 3177-3184.

Le Foll, C., B. G. Irani, C. Magnan, A. A. Dunn-Meynell et B. E. Levin (2009). Characteristics and mechanisms of hypothalamic neuronal fatty acid sensing. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 297, R655-664.

Lecka-Czernik, B., I. Gubrij, E. J. Moerman, O. Kajkenova, D. A. Lipschitz, S. C. Manolagas et R. L. Jilka (1999). Inhibition of Osf2/Cbfa1 expression and terminal osteoblast differentiation by PPARgamma2. *J Cell Biochem*, 74, 357-371.

Lee, B., K. Thirunavukkarasu, L. Zhou, L. Pastore, A. Baldini, J. Hecht, V. Geoffroy, P. Ducy et G. Karsenty (1997). Missense mutations abolishing DNA binding of the osteoblast-specific transcription factor OSF2/CBFA1 in cleidocranial dysplasia. *Nat Genet*, 16, 307-310.

Lee, E., A. Salic, R. Kruger, R. Heinrich et M. W. Kirschner (2003a). The roles of APC and Axin derived from experimental and theoretical analysis of the Wnt pathway. *PLoS Biol*, 1, E10.

Lee, J. E. et G. Kai (2014). Transcriptional and epigenetic regulation of $PPAR\gamma$ expression during adipogenesis. *Cell Biosci*, 4:29.

Lee, K., H. Jessop, R. Suswillo, G. Zaman et L. Lanyon (2003b). Endocrinology: bone adaptation requires oestrogen receptor-alpha. *Nature*, 424, 389.

Lefebvre, V., W. Huang, V. R. Harley, P. N. Goodfellow et B. de Crombrugghe (1997). SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol*, 17, 2336-2346.

Legrand, C., D. Pidard, P. Beiso, D. Tenza et L. Edelman (1991). Interaction of a Monoclonal Antibody to Glycoprotein IV (CD36) with Human Platelets and its Effect on Platelet Function. *Platelets*, 2, 99-105.

Lepretre, F., K. J. Linton, C. Lacquemant, V. Vatin, C. Samson, C. Dina, M. Chikri, S. Ali, P. Scherer, K. Seron et al. (2004). Genetic study of the CD36 gene in a French diabetic population. *Diabetes Metab*, 30, 459-463.

Li, D. et J. L. Mehta (2000). Upregulation of endothelial receptor for oxidized LDL (LOX-l) by oxidized LDL and implications in apoptosis of human coronary artery endothelial cells: evidence from use of antisense LOX-l rnRNA and chemical inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20, 1116-1122.

Li, J., I. Sarosi, R. C. Cattley, J. Pretorius, F. Asuncion, M. Grisanti, S. Morony, S. Adamu, Z. Geng, W. Qiu et al. (2006). Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia. *Bone*, 39, 754-766.

Li, P., E. M. Schwarz, R. J. O'Keefe, L. Ma, R. J. Looney, C. T. Ritchlin, B. F. Boyce et L. Xing (2004). Systemic tumor necrosis factor alpha mediates an increase in peripheral CD11bhigh osteoclast precursors in tumor necrosis factor alpha-transgenic mice. *Arthritis Rheum*, 50, 265-276.

Li, W., P. Klenotic et R. Silverstein (2012). Thrombospondin 1/CD36 signaling promotes vascular smooth muscle cell proliferation and contributes to neointimal hyperplasia. *Circulation*, 126, A16993.

Li, X., M.S. Ominsky, Q.T. Niu, N. Sun, B. Daugherty, D. D'Agostin, C. Kurahara, Y. Gao, J. Cao, J. Gong et al (2008). Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength. *J Bone Miner Res*, 23, 860-869.

Li, X., Y. Zhang, H. Kang, W. Liu, P. Liu, J. Zhang, S.E. Harris, D. Wu (2005). Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem*, 280, 19883-19887.

Lian, J. B., G. S. Stein, A. Javed, A. J. van Wijnen, J. L. Stein, M. Montecino, M. Q. Hassan, T. Gaur, C. J. Lengner et D. W. Young (2006). Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord*, 7, 1-16.

Lian, J. B., M. Tassinari et J. Glowacki (1984). Resorption of implanted bone prepared from normal and warfarin-treated rats. *J Clin Invest*, 73, 1223-1226.

Lin, C., X. Jiang, Z. Dai, X. Guo, T. Weng, J. Wang, Y. Li, G. Feng, X. Gao et L. He (2009). Sclerostin mediates bone response to mechanical unloading through antagonizing Wnt/beta-catenin signaling. *J Bone Miner Res*, 24, 1651-1661.

Lips, P. (2001). Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev*, 22, 477-501.

Lipsky, R. H., D. M. Eckert, Y. Tang et C. F. Ockenhouse (1997). The carboxylterminal cytoplasmic domain of CD36 is required for oxidized low-density lipoprotein modulation of NF-kappaB activity by tumor necrosis factor-alpha. *J Recept Signal Transduct*, 7, 1-11.

Liu, L. F., W. J. Shen, Z. H. Zhang, L. J. Wang et F. B. Kraemer (2010). Adipocytes decrease Runx2 expression in osteoblastic cells: roles of PPARgamma and adiponectin. *J Cell Physiol*, 225, 837-845.

Liu, Y. J., L. Zhang, C. J. Papasian et H. W. Deng (2014). Genome-wide association studies for osteoporosis: A 2013 Update. *J Bone Metab*, 21, 99-116.

Locklin, R. M., R. O. Oreffo et J. T. Triffitt (1999). Effects of TGFbeta and bFGF on the differentiation of human bone marrow stromal fibroblasts. *Cell Biol Int*, 23, 185-194.

Logan, C. Y. et R. Nusse (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. Annu Rev Cell Dev Biol, 20, 781-810.

Lohmann, C. H., Z. Schwartz, G. Koster, U. Jahn, G. H. Buchhorn, M. J. MacDougall, D. Casasola, Y. Liu, V. L. Sylvia, D. D. Dean et al. (2000). Phagocytosis of wear debris by osteoblasts affects differentiation and local factor production in a manner dependent on particle composition. *Biomaterials*, 21, 551-561.

Loots, G. G., M. Kneissel, H. Keller, M. Baptist, J. Chang, N. M. Collette, D. Ovcharenko, I. Plajzer-Frick et E. M. Rubin (2005). Genomic deletion of a long-

range bone enhancer misregulates sclerostin in Van Buchem disease. Genome Res, 15, 928-935.

Luangrath, V., M. R. Brodeur, D. Rhainds et L. Brissette (2008). Mouse CD36 has opposite effects on LDL and oxidized LDL metabolism in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28, 1290-1295.

Luiken, J. J., S. L. Coort, J. Willems, W. A. Coumans, A. Bonen, G. J. van der Vusse et J. F. Glatz (2003). Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling. *Diabetes*, 52, 1627-1634.

Luiken, J. J., D. J. Dyck, X. X. Han, N. N. Tandon, Y. Arumugam, J. F. Glatz et A. Bonen (2002). Insulin induces the translocation of the fatty acid transporter FAT/CD36 to the plasma membrane. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 282, E491-495.

Lukic, I. K., D. Grcevic, N. Kovacic, V. Katavic, S. Ivcevic, I. Kalajzić et A. Marusić (2005). Alteration of newly induced endochondral bone formation in adult mice without tumour necrosis factor receptor 1. *Clin Exp Immunol*, 139, 236-244.

Luu, H. H., W. X. Song, X. Luo, D. Manning, J. Luo, Z. L. Deng, K. A. Sharff, A. G. Montag, R. C. Haydon et T. C. He (2007). Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 25, 665-677.

Maccarinelli, G., V. Sibilia, A. Torsello, F. Raimondo, M. Pitto, A. Giustina, C. Netti et D. Cocchi (2005). Ghrelin regulates proliferation and differentiation of osteoblastic cells. *J Endocrinol*, 184, 249-256.

MacDonald, B. T., D. M. Joiner, S. M. Oyserman, P. Sharma, S. A. Goldstein, X. He et P. V. Hauschka (2007). Bone mass is inversely proportional to Dkk1 levels in mice. *Bone*, 41, 331-339.

MacDonald, B. T., K. Tamai et X. He (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*, 17, 9-26.

Macdonald, H. M., K. K. Nishiyama, J. Kang, D. A. Hanley et S. K. Boyd (2011). Age-related patterns of trabecular and cortical bone loss differ between sexes and skeletal sites: a population-based HR-pQCT study. *J Bone Miner Res*, 26, 50-62.

Mackie, E. (2003). Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int J Biochem Cell Biol*, 35, 1301-1305.

Mackie, E. J., Y. A. Ahmed, L. Tatarczuch, K. S. Chen et M. Mirams (2008). Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol*, 40, 46-62.

Mackie, E. J., L. Tatarczuch et M. Mirams (2011). The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *J Endocrinol*, 211, 109-121.

Maeno, Y., H. Fujioka, M. R. Hollingdale, C. F. Ockenhouse, S. Nakazawa et M. Aikawa (1994). Ultrastructural Jocalization of CD36 in human hepatic sinusoidal lining cells, hepatocytes, human hepatoma (HepG2-A 16) cells, and C32 amelanotic melanoma cells. *Exp Parasitol*, 79, 383-390.

Manolagas, S. C. (2000). Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*, 21, 115-137.

Mao, J., J. Wang, B. Liu, W. Pan, G.H. 3rd Farr C. Flynn, H. Yuan, S. Takada, D. Kimelman, L. Li et D. Wu(2001). Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cell*, 7, 801-809.

Mareschi, K., E. Biasin, W. Piacibello, M. Aglietta, E. Madon et F. Fagioli (2001). Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica*, 86, 1099-1100.

Marie, P. (2001). Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste. Med Sci (Paris), 17, 1252-1259.

Marie, P. J. et M. Kassem (2011). Osteoblasts in osteoporosis: past, emerging, and future anabolic targets. *Eur J Endocrinol*, 165, 1-10.

Marleau, S., D.Harb, K. Bujold, R. Avallone, K. Iken, Y. Wang, A. Demers, M. G. Sirois, M. Febbraio, R. L. Silverstein, A. Tremblay et H. Ong (2005). EP 80317, a ligand of the CD36 scavenger receptor, protects apolipoprotein E-deficient mice from developing atherosclerotic lesions. *FASEB J*, 13,1869-1871

Martineau, C., L. Martin-Falstrault, L. Brissette et R. Moreau (2014). Gender- and region-specific alterations in bone metabolism in Scarb1-null female mice. *J Endocrinol*, 222, 277-288.

Masuzaki, H., Y. Ogawa, N. Sagawa, K. Hosoda, T. Matsumoto, H. Mise, H. Nishimura, Y. Yoshimasa, I. Tanaka, T. Mori et al. (1997). Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med*, 3, 1029-1033.

McCalden, R. W., J. A. McGeough, M. B. Barker et C. M. Court-Brown (1993). Agerelated changes in the tensile properties of cortical bone. The relative importance of changes in porosity, mineralization, and microstructure. *J Bone Joint Surg Am*, 75, 1193-1205.

McGilvray, I. D., L. Serghides, A. Kapus, O. D. Rotstein et K. C. Kain (2000). Nonopsonic monocyte/macrophage phagocytosis of Plasmodium falciparumparasitized erythrocytes: a role for CD36 in malarial clearance. *Blood*, 96, 3231-3240.

Means, T. K., E. Mylonakis, E. Tampakakis, R. A. Colvin, E. Seung, L. Puckett, M. F. Tai, C. R. Stewart, R. Pukkila-Worley, S. E. Hickman et al. (2009). Evolutionarily conserved recognition and innate immunity to fungal pathogens by the scavenger receptors SCARF1 and CD36. *J Exp Med*, 206, 637-653.

Meregalli, M., A. Farini et Y. Torrente (2011). Mesenchymal Stem Cells as Muscle Reservoir. J Stem Cell Res Ther, 1, 1-9.

Mescher, A., ed. (2009). Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 12th edn (columbus, McGraw-Hill Education).

Miclea, R. L., M. Karperien, C. A. Bosch, G. van der Horst, M. A. van der Valk T. Kobayashi, H. M. Kronenberg, G. Rawadi, P. Akçakaya, C.W. Löwik et al. (2009). Adenomatous polyposis coli-mediated control of beta-catenin is essential for both chondrogenic and osteogenic differentiation of skeletal precursors. *BMC Dev Biol*, 9, 26.

Miller, T. W., J. S. Isenberg, H. B. Shih, Y. Wang et D. D. Roberts (2010). Amyloidbeta inhibits No-cGMP signaling in a CD36- and CD47-dependent manner. *PLoS One*, 5, e15686.

Moeller, J. B., M. J. Nielsen, M. P. Reichhardt, A. Schlosser, G. L. Sorensen, O. Nielsen, I. Tornoe, J. Gronlund, M. E. Nielsen, J. S. Jorgensen et al. (2012). CD163-L1 is an endocytic macrophage protein strongly regulated by mediators in the inflammatory response. *J Immunol*, 188, 2399-2409.

Moldes, M., Y. Zuo, R. F. Morrison, D. Silva, B. H. Park, J. Liu et S. R. Farmer (2003). Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma suppresses Wnt/beta-catenin signalling during adipogenesis. *Biochem J*, 376, 607-613.

Montagnani, A. (2014). Bone anabolics in osteoporosis: Actuality and perspectives. *World J Orthop*, 5, 247-254.

Monti, V., J. J. Carlson, S. C. Hunt et T. D. Adams (2006). Relationship of ghrelin and leptin hormones with body mass index and waist circumference in a random sample of adults. *J Am Diet Assoc*, 106, 822-828.

Moore, K. J., J. El Khoury, L. A. Medeiros, K. Terada, C. Geula, A. D. Luster et M. W. Freeman (2002). A CD36-initiated signaling cascade mediates inflammatory effects of beta-amyloid. *J Biol Chem*, 277, 47373-47379.

Moore, K. J., E. D. Rosen, M. L. Fitzgerald, F. Randow, L. P. Andersson, D. Altshuler, D. S. Milstone, R. M. Mortensen, B. M. Spiegelman et M. W. Freeman (2001). The role of PPAR-gamma in macrophage differentiation and cholesterol uptake. *Nat Med*, 7, 41-47.

Moreau, R., R. Aubin, J. Y. Lapointe et D. Lajeunesse (1997). Pharmacological and biochemical evidence for the regulation of osteocalcin secretion by potassium channels in human osteoblast-like MG-63 cells. *J Bone Miner Res*, 12, 1984-1992.

Morel, D. W., P. E. DiCorleto et G. M. Chisolm (1984). Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis*, 4, 357-364.

Morvan, F., K. Boulukos, P. Clement-Lacroix, S. Roman Roman, I. Suc-Royer, B. Vayssiere, P. Ammann, P. Martin, S. Pinho, P. Pognonec et al. (2006). Deletion of a single allele of the Dkk1 gene leads to an increase in bone formation and bone mass. *J Bone Miner Res*, 21, 934-945.

Muller, H., K. Deckers et J. Eckel (2002). The fatty acid translocase (FAT)/CD36 and the glucose transporter GLUT4 are localized in different cellular compartments in rat cardiac muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, 293, 665-669.

Munteanu, A., M. Taddei, I. Tamburini, E. Bergamini, A. Azzi et J. M. Zingg (2006). Antagonistic effects of oxidized low density lipoprotein and alpha-tocopherol on CD36 scavenger receptor expression in monocytes: involvement of protein kinase B and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Biol Chem*, 281, 6489-6497.

Murray, I., P. J. Havel, A. D. Sniderman et K. Cianflone (2000). Reduced body weight, adipose tissue, and leptin levels despite increased energy intake in female mice lacking acylation-stimulating protein. *Endocrinology*, 141, 1041-1049.

Murshed, M., D. Harmey, J. L. Millan, M. D. McKee et G. Karsenty (2005). Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes Dev*, 19, 1093-1104.

Musliner, T. A., C. Giotas et R. M. Krauss (1986). Presence of multiple subpopulations of lipoproteins of intermediate density in normal subjects. *Arteriosclerosis*, 6, 79-87.

Mwaikambo, B. R., F. Sennlaub, H. Ong, S. Chemtob et P. Hardy (2006). Activation of CD36 inhibits and induces regression of inflammatory corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47, 4356-4364.

Mwaikambo, B. R., Sennlaub F., Ong H., Chemtob S., Hardy P. (2008). Genetic ablation of CD36 induces age-related corneal neovascularization. *Cornea*, 1037-1041.

Nakae, J., T. Kitamura, Y. Kitamura, W.H. Biggs 3rd, K.C. Arden et D. Accili (2003). The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev Cell*, 4, 119-129.

Nakagawa, T., S. Nozaki, M. Nishida, J. M. Yakub, Y. Tomiyama, A. Nakata, K. Matsumoto, T. Funahashi, K. Kameda-Takemura, Y. Kurata et al. (1998). Oxidized LDL increases and interferon-gamma decreases expression of CD36 in human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18, 1350-1357.

Nakamura, I., M. G. Fernandez-Barrena, M. C. Ortiz-Ruiz, L. L. Almada, C. Hu S. F. Elsawa, L. D. Mills, P. A. Romecin, K. H. Gulaid, C. D. Moser et al. (2013) Activation of the transcription factor GLI1 by WNT signaling underlies the role of SULFATASE 2 as a regulator of tissue regeneration. *J Biol Chem*, 288, 21389-21398.

Nakashima, K., X. Zhou, G. Kunkel, Z. Zhang, J. M. Deng, R. R. Behringer et B. de Crombrugghe (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 108, 17-29.

Navazo, M. D., L. Daviet, J. Savill, Y. Ren, L. L. Leung et J. L. McGregor (1996). Identification of a domain (155-183) on CD36 implicated in the phagocytosis of apoptotic neutrophils. *J Biol Chem*, 271, 15381-15385.

Neeper, M., A. M. Schmidt, J. Brett, S. D. Yan, F. Wang, Y. C. Pan, K. Elliston, D. Stern et A. Shaw (1992). Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem*, 267, 14998-15004.

Ng, L. J., S. Wheatley, G. E. Muscat, J. Conway-Campbell, J. Bowles, E. Wright, D. M. Bell, P. P. Tam, K. S. Cheah et P. Koopman (1997). SOX9 binds DNA, activates

transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Dev Biol*, 183, 108-121.

Nicholson, A. C., M. Febbraio, J. Han, R. L. Silverstein et D. P. Hajjar (2000). CD36 in atherosclerosis. The role of a class B macrophage scavenger receptor. *Ann N Y Acad Sci*, 902, 128-131.

Nielsen, M. J., M. Madsen, H. J. Moller et S. K. Moestrup (2006). The macrophage scavenger receptor CD163: endocytic properties of cytoplasmic tail variants. *J Leukoc Biol*, 79, 837-845.

Niyibizi, C. et D. R. Eyre (1994). Structural characteristics of cross-linking sites in type V collagen of bone. Chain specificities and heterotypic links to type I collagen. *Eur J Biochem*, 224, 943-950.

Noh, T., Y. Gabet, J. Cogan, Y. Shi, A. Tank, T. Sasaki, B. Criswell, A. Dixon, C. Lee, J. Tam et al. (2009) Lef1 haploinsufficient mice display a low turnover and low bone mass phenotype in a gender- and age-specific manner. *PLoS One*, 4(5), e5438.

Noushmehr, H., E. D'Amico, L. Farilla, H. Hui, K. A. Wawrowsky, W. Mlynarski, A. Doria, N. A. Abumrad et R. Perfetti (2005). Fatty acid translocase (FAT/CD36) is localized on insulin-containing granules in human pancreatic beta-cells and mediates fatty acid effects on insulin secretion. *Diabetes*, 54, 472-481.

Ohkawara, B., A. Glinka et C. Niehrs (2011). Rspo3 binds syndecan 4 and induces Wnt/PCP signaling via clathrin-mediated endocytosis to promote morphogenesis. *Dev Cell*, 20, 303-314.

Ohtsubo, M., A. M. Theodoras, J. Schumacher, J. M. Roberts et M. Pagano (1995). Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol*, 15, 2612-2624.

Okumura, T. et G. A. Jamieson (1976). Platelet glycocalicin: a single receptor for platelet aggregation induced by thrombin or ristocetin. *Thromb Res*, 8, 701-706.

Olsen, B. R., A. M. Reginato et W. Wang (2000). Bone development. Annu Rev Cell Dev Biol, 16, 191-220.

Oquendo, P., E. Hundt, J. Lawler et B. Seed (1989). CD36 directly mediates cytoadherence of Plasmodium falciparum parasitized erythrocytes. *Cell*, 58, 95-101.

Orimo, H. (2010). The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch*, 77, 4-12.

Ortuño, M. J., S. Ruiz-Gaspà, E. Rodríguez-Carballo, A.R. Susperregui, R. Bartrons, J. L. Rosa et F. Ventura (2010). p38 regulates expression of osteoblast-specific genes by phosphorylation of osterix. *J Biol Chem*, 285, 31985-31994.

Ortuño, M.J., A.R. Susperregui, N. Artigas, J.L. Rosa et F. Ventura (2013). Osterix induces Collal gene expression through binding to Sp1 sites in the bone enhancer and proximal promoter regions. *Bone*, 52, 548-556.

Ottani, V., D. Martini, M. Franchi, A. Ruggeri et M. Raspanti (2002). Hierarchical structures in fibrillar collagens. *Micron*, 33, 587-596.

Owen, T. A., M. S. Aronow, L. M. Barone, B. Bettencourt, G. S. Stein et J. B. Lian (1991). Pleiotropic effects of vitamin D on osteoblast gene expression are related to the proliferative and differentiated state of the bone cell phenotype: dependency upon basal levels of gene expression, duration of exposure, and bone matrix competency in normal rat osteoblast cultures. *Endocrinology*, 128, 1496-1504.

Pacifici, R. (1998). Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis--the second decade. *Endocrinology*, 139, 2659-2661.

Padhi, D., G. Jang, B. Stouch, L. Fang et E. Posvar (2011). Single-dose, placebocontrolled, randomized study of AMG 785, a sclerostin monoclonal antibody. *J Bone Miner Res*, 26, 19-26.

Pandur, P., D. Maurus et M. Kuhl (2002). Increasingly complex: new players enter the Wnt signaling network. *Bioessays*, 24, 881-884.

Paolucci, M., S. Buono, R. Sciarrillo et R. Putti (2006). Effects of leptin administration on the endocrine pancreas and liver in the lizard Podarcis sicula. *J Exp Zool A Comp Exp Biol*, 305, 383-395.

Parfitt, A. M. (1984). Age-related structural changes in trabecular and cortical bone: cellular mechanisms and biomechanical consequences. *Calcif Tissue Int*, 36 Suppl 1, S123-128.

Parhami, F., A. D. Morrow, J. Balucan, N. Leitinger, A. D. Watson, Y. Tintut, J. A. Berliner et L. L. Demer (1997) Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17, 680–687.

Parhami, F. (2003). Possible role of oxidized lipids in osteoporosis : could hyperlipidemia be a risk factor? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 68, 373-378.

Park, H. K. et R. S. Ahima (2014). Leptin signaling. F1000Prime Rep. 6, 73.

Park, J., J. J. Zhang, A. Moro, M. Kushida, M. Wegner et P. C. Kim (2010) Regulation of Sox9 by Sonic Hedgehog (Shh) is essential for patterning and formation of tracheal cartilage. *Dev Dyn*, 239, 514-526.

Park, S. Y., M. Y. Jung, S. J. Lee, K. B. Kang, A. Gratchev, V. Riabov, J. Kzhyshkowska et I. S. Kim (2009a). Stabilin-1 mediates phosphatidylserine-dependent clearance of cell corpses in alternatively activated macrophages. *J Cell Sci*, 122, 3365-3373.

Park, Y. M. (2014). CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. *Exp Mol Med*, 46, e99.

Park, Y. M., M. Febbraio et R. L. Silverstein (2009b). CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima. *J Clin Invest*, 119, 136-145.

Patel, S. N., L. Serghides, T. G. Smith, M. Febbraio, R. L. Silverstein, T. W. Kurtz, M. Pravenec et K. C. Kain (2004). CD36 mediates the phagocytosis of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes by rodent macrophages. *J Infect Dis*, 189, 204-213.

Pearson, A., A. Lux et M. Krieger (1995). Expression cloning of dSR-CI, a class C macrophage-specific scavenger receptor from Drosophila melanogaster. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 4056-4060.

Petrova, R. et A. L. Joyner (2014) Roles for Hedgehog signaling in adult organ homeostasis and repair. *Development*, 141, 3445-3457.

Pettersson, I., G. Muccioli, R. Granata, R. Deghenghi, E. Ghigo, C. Ohlsson et J. Isgaard (2002). Natural (ghrelin) and synthetic (hexarelin) GH secretagogues stimulate H9c2 cardiomyocyte cell proliferation. *J Endocrinol*, 175, 201-209.

Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig et D. R. Marshak (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 143-147.

Pluddemann, A., C. Neyen et S. Gordon (2007). Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands. *Methods*, 43, 207-217.

Podrez, E. A., T. V. Byzova, M. Febbraio, R. G. Salomon, Y. Ma, M. Valiyaveettil, E. Poliakov, M. Sun, P. J. Finton, B. R. Curtis et al. (2007). Platelet CD36 links hyperlipidemia, oxidant stress and a prothrombotic phenotype. *Nat Med*, 13, 1086-1095.

Portal-Nunez, S., D. Lozano et P. Esbrit (2012). Role of angiogenesis on bone formation. *Histol Histopathol*, 27, 559-566.

Prabhudas, M., D. Bowdish, K. Drickamer, M. Febbraio, J. Herz, L. Kobzik, M. Krieger, J. Loike, T. K. Means, S. K. Moestrup et al. (2014). Standardizing scavenger receptor nomenclature. *J Immunol*, 192, 1997-2006.

Prieto, J., A. Eklund et M. Patarroyo (1994). Regulated expression of integrins and other adhesion molecules during differentiation of monocytes into macrophages. *Cell Immunol*, 156, 191-211.

Qin, L., P. Qiu, L. Wang, X. Li, J. T. Swarthout, P. Soteropoulos, P. Tolias et N. C. Partridge (2003). Gene expression profiles and transcription factors involved in parathyroid hormone signaling in osteoblasts revealed by microarray and bioinformatics. *J Biol Chem*, 278, 19723-19731.

Qu, Q., M. Perala-Heape, A. Kapanen, J. Dahllund, J. Salo, H. K. Vaananen et P. Harkonen (1998). Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. *Bone*, 22, 201-209.

Raghu, G., S. Masta, D. Meyers et A. S. Narayanan (1989). Collagen synthesis by normal and fibrotic human lung fibroblasts and the effect of transforming growth factor-beta. *Am Rev Respir Dis*, 140, 95-100.

Rahaman, S. O., D. J. Lennon, M. Febbraio, E. A. Podrez, S. L. Hazen et R. L. Silverstein (2006). A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation. *Cell Metab*, 4, 211-221.

Rahaman, S. O., W. Swat, M. Febbraio et R. L. Silverstein (2011). Vav family Rho guanine nucleotide exchange factors regulate CD36-mediated macrophage foam cell formation. *J Biol Chem*, 286, 7010-7017.

Rajamannan N. M., M. Subramaniam et D. Rickard (2003). Human aortic valve calcification is associated with osteoblast phenotype. *Circulation*, 107, 2181–2184.

Raisz, L. G. (2005). Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest*, 115, 3318-3325.

Ramprasad, M. P., V. Terpstra, N. Kondratenko, O. Quehenberger et D. Steinberg (1996). Cell surface expression of mouse macrosialin and human CD68 and their role as macrophage receptors for oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 14833-14838.

Rege, T. A., J. Stewart, Jr., B. Dranka, E. N. Benveniste, R. L. Silverstein et C. L. Gladson (2009). Thrombospondin-1-induced apoptosis of brain microvascular endothelial cells can be mediated by TNF-R1. *J Cell Physiol*, 218, 94-103.

Reid, D. M., M. Montoya, P. R. Taylor, P. Borrow, S. Gordon, G. D. Brown et S. Y. Wong (2004). Expression of the beta-glucan receptor, Dectin-1, on murine leukocytes in situ correlates with its function in pathogen recognition and reveals potential roles in leukocyte interactions. *J Leukoc Biol*, 76, 86-94.

Reid, I. R. et J. Comish (2004). Direct Actions of Leptin on Bone Remodeling. *Calcif Tissue Int*, 74, 313-316.

Ren, D., T. N. Collingwood, E. J. Rebar, A. P. Wolffe et H. S. Camp (2002). PPARgamma knockdown by engineered transcription factors: exogenous PPARgamma2 but not PPARgamma1 reactivates adipogenesis. *Genes Dev*, 16, 27-32.

Renault, M., A., J. Roncalli, J. Tongers, T. Thorne, E S. Klyachko, Misener, O.V. Volpert, S. Mehta, A. Burg, C. Luedemann et al. (2010) Sonic hedgehog induces angiogenesis via Rho kinase-dependent signaling in endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol*, 49, 490-498.

Reseland, J. E., U. Syversen, I. Bakke, G. Qvigstad, L. G. Eide, O. Hjertner, J. O. Gordeladze et C. A. Drevon (2001). Leptin is expressed in and secreted from primary cultures of human osteoblasts and promotes bone mineralization. *J Bone Miner Res*, 16, 1426-1433.

Richards, J. B., H. F. Zheng et T. D. Spector (2012). Genetics of osteoporosis from genome-wide association studies: advances and challenges. *Nat Rev Genet*, 13, 576-588.

Risteli, L. et J. Risteli (1993). Biochemical markers of bone metabolism. Ann Med, 25, 385-393.

Rivera, A., A. Mavila, K. J. Bayless, G. E. Davis et S. A. Maxwell (2006). Cyclin A1 is a p53-induced gene that mediates apoptosis, G2/M arrest, and mitotic catastrophe in renal, ovarian, and lung carcinoma cells. *Cell Mol Life Sci*, 63, 1425-1439.

Rosen, E. D., C. H. Hsu, X. Wang, S. Sakai, M. W. Freeman, F. J. Gonzalez et B. M. Spiegelman (2002). C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev*, 16, 22-26.

Rothblat, G. H. et M. C. Phillips (2010). High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol*, 21, 229-238.

Ruggiero, F., M. Roulet et C. Bonod-Bidaud (2005). Dermis collagens: beyond their structural properties. *J Soc Biol*, 199, 301-311.

Ruiz-Gaspa, S., J. Blanch-Rubio, M. Ciria-Recasens, J. Monfort, L. Tio, N. Garcia-Giralt, X. Nogues, J. C. Monllau, J. Carbonell-Abello et L. Perez-Edo (2010). Reduced proliferation and osteocalcin expression in osteoblasts of male idiopathic osteoporosis. *Calcif Tissue Int*, 86, 220-226.

Ryeom, S. W., R. L. Silverstein, A. Scotto et J. R. Sparrow (1996). Binding of anionic phospholipids to retinal pigment epithelium may be mediated by the scavenger receptor CD36. *J Biol Chem*, 271, 20536-20539.

Sandoval, J. C., Y. Nakagawa-Toyama, D. Masuda, Y. Tochino, H. Nakaoka, R. Kawase, M. Yuasa-Kawase, K. Nakatani, M. Inagaki, K. Tsubakio-Yamamoto et al. (2010). Fenofibrate reduces postprandial hypertriglyceridemia in CD36 knockout mice. *J Atheroscler Thromb*, 17, 914-924.

Sampson, M. J., I. R. Davies, S. Braschi, K. Ivory et D. A. Hughes (2003). Increased expression of a scavenger receptor (CD36) in monocytes from subjects with Type 2 diabetes. *Atherosclerosis*, 167, 129-134.

Sato, O., C. Kuriki, Y. Fukui et K. Motojima (2002). Dual promoter structure of mouse and human fatty acid translocase/CD36 genes and unique transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma ligands. *J Biol Chem*, 277, 15703-15711.

Sato, S., R. Hanada, A. Kimura, T. Abe, T. Matsumoto, M. Iwasaki, H. Inose, T. Ida, M. Mieda, Y. Takeuchi et al. (2007). Central control of bone remodelling by neuromedin U. *Nature Med*, 13, 1234-1240.

Savill, J., V. Fadok, P. Henson et C. Haslett (1993). Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today*, 14, 131-136.

Savill, J. S., A. H. Wyllie, J. E. Henson, M. J. Walport, P. M. Henson et C. Haslett (1989). Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest*, 83, 865-875.

Sawamura, T., N. Kume, T. Aoyama, H. Moriwaki, H. Hoshikawa, Y. Aiba, T. Tanaka, S. Miwa, Y. Katsura, T. Kita et al. (1997). An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature*, 386, 73-77.

Schwartz, G. J., J. Fu, G. Astarita, X. Li, S. Gaetani, P. Campolongo, V. Cuomo et D. Piomelli (2008). The lipid messenger OEA links dietary fat intake to satiety. *Cell Metab*, 8, 281-288.

Sedova, L., F. Liska, D. Krenova, L. Kazdova, J. Tremblay M. Krupková, G. Corbeil, P. Hamet, V. Křen et O. Šeda (2012) CD36-deficient congenic strains show improved glucose tolerance and distinct shifts in metabolic and transcriptomic profiles. *Heredity (Edinb)*, 109, 63-70.

Seibel, M. J. (2000). Molecular markers of bone turnover: biochemical, technical and analytical aspects. *Osteoporos Int*, 11 Suppl 6, S18-29.

Sfeir, Z., A. Ibrahimi, E. Amri, P. Grimaldi et N. Abumrad (1997). Regulation of FAT/CD36 gene expression: further evidence in support of a role of the protein in fatty acid binding/transport. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 57, 17-21.

Shalhoub, V., F. Aslam, E. Breen, A. van Wijnen, R. Bortell, G. S. Stein, J. L. Stein et J. B. Lian (1998). Multiple levels of steroid hormone-dependent control of osteocalcin during osteoblast differentiation: glucocorticoid regulation of basal and vitamin D stimulated gene expression. *J Cell Biochem*, 69, 154-168.

Shaw, S. (1987). Characterization of human leukocyte differentiation antigens. *Immunol Today*, 8, 1-3.

Sheikine, Y. et A. Sirsjo (2008). CXCL16/SR-PSOX--a friend or a foe in atherosclerosis? Atherosclerosis, 197, 487-495.

Shekaran, A. et A. J. Garcia (2011). Extracellular matrix-mimetic adhesive biomaterials for bone repair. *J Biomed Mater Res A*, 96, 261-272.

Shen, C. L., J. K. Yeh, J. J. Cao et J. S. Wang (2009). Green tea and bone metabolism. *Nutr Res*, 29, 437-456.

Shen, M., F. Lin, J. Zhang, Y. Tang, W-K. Chen et H. Liu (2012). Involvement of the Up-regulated FoxO1 expression in follicular granulosa cell apoptosis induced by oxidative stress. *J Biol Chem*, 287, 25727–25740.

Sherr, C. J. (1994). G1 phase progression: cycling on cue. Cell, 79, 551-555.

Shi, Y., V. K. Yadav, N. Suda, X. S. Liu, X. E. Guo, M. G. Myers, Jr. et G. Karsenty (2008). Dissociation of the neuronal regulation of bone mass and energy metabolism by leptin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 20529-20533.

Shimaoka, T., N. Kume, M. Minami, K. Hayashida, H. Kataoka, T. Kita et S. Yonehara (2000). Molecular cloning of a novel scavenger receptor for oxidized low density lipoprotein, SR-PSOX, on macrophages. *J Biol Chem*, 275, 40663-40666.

Shiotani, A., M. Takami, K. Itoh, Y. Shibasaki et T. Sasaki (2002). Regulation of osteoclast differentiation and function by receptor activator of NFkB ligand and osteoprotegerin. *Anat Rec*, 268, 137-146.

Shockley, K. R., O. P. Lazarenko, P. J. Czernik, C. J. Rosen, G. A. Churchill et B. Lecka-Czernik (2009). PPARgamma2 nuclear receptor controls multiple regulatory pathways of osteoblast differentiation from marrow mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*, 106, 232-246.

Silver, I. A., R. J. Murrills et D. J. Etherington (1988). Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp Cell Res*, 175, 266-276.

Silverstein, R. L. (2009). Inflammation, atherosclerosis, and arterial thrombosis: role of the scavenger receptor CD36. *Cleve Clin J Med*, 76 Suppl 2, S27-30.

Silverstein, R. L. et M. Febbraio (2009). CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal*, 2, re3.

Simonet, W. S., D. L. Lacey, C. R. Dunstan, M. Kelley, M. S. Chang, R. Luthy, H. Q. Nguyen, S. Wooden, L. Bennett, T. Boone et al. (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 89, 309-319.

Sipes, J. M., H. C. Krutzsch, J. Lawler et D. D. Roberts (1999). Cooperation between thrombospondin-1 type 1 repeat peptides and alpha(v)beta(3) integrin ligands to promote melanoma cell spreading and focal adhesion kinase phosphorylation. *J Biol Chem*, 274, 22755-22762.

Siqueira M.F., S. Flowers, R. Bhattacharya, D. Faibish, Y. Behl, D.N. Kotton, L. Gerstenfeld, E. Moran et D.T. Graves (2011) FOXO1 modulates osteoblast differentiation. *Bone*, 48, 1043-1051.

Smallwood, P. M., J. Williams, Q. Xu, D. J. Leahy et J. Nathans (2007). Mutational analysis of Norrin-Frizzled4 recognition. *J Biol Chem*, 282, 4057-4068.

Smith, J., X. Su, R. El-Maghrabi, P. D. Stahl et N. A. Abumrad (2008). Opposite regulation of CD36 ubiquitination by fatty acids and insulin: effects on fatty acid uptake. *J Biol Chem*, 283, 13578-13585.

Souidi, M., S. Dubrac, M. Parquet, D. H. Volle, J. M. Lobaccaro, D. Mathe, O. Combes, P. Scanff, C. Lutton et J. Aigueperse (2004). Oxysterols: metabolism, biological role and associated diseases. *Gastroenterol Clin Biol*, 28, 279-293.

Steinberg, D. (1997). Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem*, 272, 20963-20966.

Steinbusch, L. K., R. W. Schwenk, D. M. Ouwens, M. Diamant, J. F. Glatz et J. J. Luiken (2011). Subcellular trafficking of the substrate transporters GLUT4 and CD36 in cardiomyocytes. *Cell Mol Life Sci*, 68, 2525-2538.

Stewart, C. R., L. M. Stuart, K. Wilkinson, J. M. van Gils, J. Deng, A. Halle, K. J. Rayner, L. Boyer, R. Zhong, W. A. Frazier et al. (2010). CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol*, 11, 155-161.

Stuart, L. M., S. A. Bell, C. R. Stewart, J. M. Silver, J. Richard, J. L. Goss, A. A. Tseng, A. Zhang, J. B. El Khoury et K. J. Moore (2007). CD36 signals to the actin cytoskeleton and regulates microglial migration via a p130Cas complex. *J Biol Chem*, 282, 27392-27401.

Stuart, L. M., J. Deng, J. M. Silver, K. Takahashi, A. A. Tseng, E. J. Hennessy, R. A. Ezekowitz et K. J. Moore (2005). Response to Staphylococcus aureus requires CD36mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. *J Cell Biol*, 170, 477-485.

Stuart, L. M., J. Deng, J. M. Silver, K. Takahashi, A. A. Tseng, E. J. Hennessy, R. A. Ezekowitz et K. J. Moore (2005). Response to Staphylococcus aureus requires CD36mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. *J Cell Biol*, 170, 477-485. Suda, T., N. Takahashi, N. Udagawa, E. Jimi, M. T. Gillespie et T. J. Martin (1999). Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev*, 20, 345-357.

Suzuki, H., Y. Kurihara, M. Takeya, N. Kamada, M. Kataoka, K. Jishage, O. Ueda, H. Sakaguchi, T. Higashi, T. Suzuki et al. (1997). A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature*, 386, 292-296.

Suzuki, M., Q. Ding, S. Muranaka, M. Kigure, M. Kojima, M. Terada, N. Kataoka, A. Hagiwara, P. Kromkhun, N. Moritani et al. (2008). Correlation between body weight (epididymal fat) and permeation rate of serum leptin through the blood-brain barrier (BBB) in male rats aged 8 months. *Exp Anim*, 57, 485-488.

Takada, I., M. Mihara, M. Suzawa, F. Ohtake, S. Kobayashi, M. Igarashi, M. Y. Youn, K. Takeyama, T. Nakamura, Y. Mezaki et al. (2007). A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signalling suppresses PPAR-gamma transactivation. *Nat Cell Biol*, 9, 1273-1285.

Takahashi, T., S. So, D. Wang, K. Takahashi, N. Kurihara et M. Kumegawa (1986). Phagocytosis of different matrix components by different cell types at bone-forming sites in cultured mouse calvariae. *Cell Tissue Res*, 245, 9-17.

Takahashi, Y., Y. Okimura, I. Mizuno, K. Iida, T. Takahashi, H. Kaji, H. Abe et K. Chihara (1997). Leptin induces mitogen-activated protein kinase-dependent proliferation of C3H10T1/2 cells. *J Biol Chem*, 272, 12897-12900.

Takeda, S., J.P. Bonnamy, M.J. Owen, P. Ducy et G. Karsenty (2001). Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. *Genes Dev*, 15, 467–481.

Takeda, S., F. Elefteriou, R. Levasseur, X. Liu, L. Zhao, K.L. Parker, D. Armstrong, P. Ducy et G. Karsenty (2002). Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell*, 111, 305-317.

Talle, M. A., N. Allegar, M. Makowski, P. E. Rao, R. S. Mittler et G. Goldstein (1983). Classification of human lymphocytes and monocytes with the OK series of monoclonal antibodies. *Diagn Immunol*, 1, 129-135.

Tanaka, K., E. Matsumoto, Y. Higashimaki, T. Katagiri, T. Sugimoto, S. Seino et H. Kaji (2012) Role of Osteoglycin in the Linkage between Muscle and Bone. *J Biol Chem*, 287, 11616–11628.

Tanaka, T., T. Nakata, T. Oka, T. Ogawa, F. Okamoto, Y. Kusaka, K. Sohmiya, K. Shimamoto et K. Itakura (2001). Defect in human myocardial long-chain fatty acid uptake is caused by FAT/CD36 mutations. *J Lipid Res*, 42, 751-759.

Tanaka, T., K. Sohmiya et K. Kawamura (1997). Is CD36 deficiency an etiology of hereditary hypertrophic cardiomyopathy? *J Mol Cell Cardiol*, 29, 121-127.

Tandon, N. N., R. H. Lipsky, W. H. Burgess et G. A. Jamieson (1989). Isolation and Characterization of Platelet Glycoprotein IV (CD36). *J Biol Chem*, 264, 7570-7575.

Tang, Y., K. T. Taylor, D. A. Sobieski, E. S. Medved et R. H. Lipsky (1994). Identification of a human CD36 isoform produced by exon skipping. Conservation of exon organization and pre-mRNA splicing patterns with a CD36 gene family member, CLA-1. *J Biol Chem*, 269, 6011-6015.

Tao, N., S. J. Wagner et D. M. Lublin (1996). CD36 is palmitoylated on both N- and C-terminal cytoplasmic tails. *J Biol Chem*, 271, 22315-22320.

Tarakida, A., K. Iino, K. Abe, R. Taniguchi, T. Higuchi, H. Mizunuma et S. Nakaji (2011). Hypercholesterolemia accelerates bone loss in postmenopausal women. *Climacteric*, 14, 105-111.

Tartaglia, L. A., M. Dembski, X. Weng, N. Deng, J. Culpepper, R. Devos, G. J. Richards, L. A. Campfield, F. T. Clark, J. Deeds et al. (1995). Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*, 83, 1263-1271.

Teboul, L., M. Febbraio, D. Gaillard, E. Z. Amri, R. Silverstein et P. A. Grimaldi (2001). Structural and functional characterization of the mouse fatty acid translocase promoter: activation during adipose differentiation. *Biochem J*, 360, 305-312.

Teitelbaum, S. L. et F. P. Ross (2003). Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet*, 4, 638-649.

Terpstra, V., E. S. van Amersfoort, A. G. van Velzen, J. Kuiper et T. J. van Berkel (2000). Hepatic and extrahepatic scavenger receptors: function in relation to disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20, 1860-1872.

Thomas, T., B. Burguera, L. J. Melton, 3rd, E. J. Atkinson, W. M. O'Fallon, B. L. Riggs et S. Khosla (2001). Role of serum leptin, insulin, and estrogen levels as potential mediators of the relationship between fat mass and bone mineral density in men versus women. *Bone*, 29, 114-120.

Thomas, T., F. Gori, S. Khosla, M. Jensen, B. Burguera et B. Riggs (1999). Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology*, 140, 1630-1638.

Thorne, R. F., J. F. Marshall, D. R. Shafren, P. G. Gibson, I. R. Hart et G. F. Burns (2000). The integrins alpha3beta1 and alpha6beta1 physically and functionally associate with CD36 in human melanoma cells. Requirement for the extracellular domain of CD36. *J Biol Chem*, 275, 35264-35275.

Thorne, R. F., K. J. Ralston, C. E. de Bock, N. M. Mhaidat, X. D. Zhang, A. W. Boyd et G. F. Burns (2010). Palmitoylation of CD36/FAT regulates the rate of its post-transcriptional processing in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta*, 1803, 1298-1307.

Thuahnai, S. T., S. Lund-Katz, P. Dhanasekaran, M. de la Llera-Moya, M. A. Connelly, D. L. Williams, G. H. Rothblat et M. C. Phillips (2004). Scavenger receptor class B type I-mediated cholesteryl ester-selective uptake and efflux of unesterified cholesterol. Influence of high density lipoprotein size and structure. J Biol Chem, 279, 12448-12455.

Tintut, Y., S. Moron et L. L. Deme (2004). Hyperlipidemia promotes osteoclastic potential of bone marrow cells ex vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24, e6-10.

Tontonoz, P., E. Hu et B. M. Spiegelman (1994). Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*, 79, 1147-1156.

Tontonoz, P. et L. Nagy (1999). Regulation of macrophage gene expression by peroxisome-proliferator-activated receptor gamma: implications for cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*, 10, 485-490.

Tontonoz, P., L. Nagy, J. G. Alvarez, V. A. Thomazy et R. M. Evans (1998). PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*, 93, 241-252.

Travis, A., A. Amsterdam, C. Belanger et R. Grosschedl (1991). LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function. *Genes Dev*, 5, 880-894.

Trentz, O. A., A. E. Handschin, S. Hemmi, G. Zund, G. A. Wanner et O. Trentz (2004). Leptin regulates human osteoblast proliferation and phenotype marker expression in vitro. *Eur Cell Mater*, 7, Suppl. 1, 89.

Triantafilou, M., F. G. Gamper, P. M. Lepper, M. A. Mouratis, C. Schumann, E. Harokopakis, R. E. Schifferle, G. Hajishengallis et K. Triantafilou (2007). Lipopolysaccharides from atherosclerosis-associated bacteria antagonize TLR4, induce formation of TLR2/1/CD36 complexes in lipid rafts and trigger TLR2-induced inflammatory responses in human vascular endothelial cells. *Cell Microbiol*, 9, 2030-2039.

Truong, T. Q., D. Aubin, L. Falstrault, M. R. Brodeur et L. Brissette (2010). SR-BI, CD36, and caveolin-1 contribute positively to cholesterol efflux in hepatic cells. *Cell Biochem Funct*, 28, 480-489.

Tsuda, E., M. Goto, S. Mochizuki, K. Yano, F. Kobayashi, T. Morinaga et K. Higashio (1997). Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 234, 137-142.

Tu, H., A. J. Kastin, H. Hsuchou et W. Pan (2008). Soluble receptor inhibits leptin transport. *J Cell Physiol*, 214, 301-305.

Turner, C. H. et F. M. Pavalko (1998). Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation. *J Orthop Sci*, 3, 346-355.

Turner, R. T., S. P. Kalra, C. P. Wong, K. A. Philbrick, L. B. Lindenmaier, S. Boghossian et U. T. Iwaniec (2013). Peripheral leptin regulates bone formation. J Bone Miner Res, 28, 22-34.

Ueta, C., M. Iwamoto, N. Kanatani, C. Yoshida, Y. Liu, M. Enomoto-Iwamoto, T. Ohmori, H. Enomoto, K. Nakata, K. Takada et al. (2001). Skeletal malformations caused by overexpression of Cbfa1 or its dominant negative form in chondrocytes. *J Cell Biol*, 153, 87–100.

Vallbo, C. et J. E. Damber (2005). Thrombospondins, metallo proteases and thrombospondin receptors messenger RNA and protein expression in different tumour sublines of the Dunning prostate cancer model. *Acta Oncol*, 44, 293-298.

Valverde-Franco, G., H. Liu, D. Davidson, S. Chai, H. Valderrama-Carvajal, D. Goltzman, D. M. Ornitz et J. E. Henderson (2004). Defective bone mineralization and osteopenia in young adult FGFR3-/- mice. *Hum Mol Genet*, 13, 271-284.

van de Peppel, J. et J. P. van Leeuwen (2014). Vitamin D and gene networks in human osteoblasts. *Front Physiol*, 5, 137.

van der Vos, K. E. et P. J. Coffer (2008). FOXO-binding partners: it takes two to tango. *Oncogene*, 27, 2289-2299.

van Genderen, C., R. M. Okamura, I. Farinas, R. G. Quo, T. G. Parslow, L. Bruhn et R. Grosschedl (1994) Development of several organs that require inductive epithelialmesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. *Genes Dev*, 8, 2691-2703.

van Hoof, V.O. et M.E. De Broe (1994) Interpretation and clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme patterns. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 31, 197-293.

van Schravendijk, M. R., S. M. Handunnetti, J. W. Barnwell et R. J. Howard (1992). Normal human erythrocytes express CD36, an adhesion molecule of monocytes, platelets, and endothelial cells. *Blood*, 80, 2105-2114.

van Staa, T. P., H. G. Leufkens, L. Abenhaim, B. Zhang et C. Cooper (2000). Oral corticosteroids and fracture risk: relationship to daily and cumulative doses. *Rheumatology (Oxford)*, 39, 1383-1389.

Vanella, L., K. Sodhi, D. H. Kim, N. Puri, M. Maheshwari, T. D. Hinds, L. Bellner, D. Goldstein, S. J. Peterson, J. I. Shapiro et al. (2013). Increased heme-oxygenase 1 expression in mesenchymal stem cell-derived adipocytes decreases differentiation and lipid accumulation via upregulation of the canonical Wnt signaling cascade. *Stem Cell Res Ther*, 4, 28.

Viguet-Carrin, S., P. Garnero, P. D. Delmas (2006). The role of collagen in bone strength. Osteoporos Int, 17, 319-336.

Volpert, O. V., T. Zaichuk, W. Zhou, F. Reiher, T. A. Ferguson, P. M. Stuart, M. Amin et N. P. Bouck (2002). Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. *Nat Med*, 8, 349-357.

Vroegrijk, I. O., J. B. van Klinken, J. A. van Diepen, S. A. van den Berg, M. Febbraio, L. K. Steinbusch, J. F. Glatz, L. M. Havekes, P. J. Voshol, P. C. Rensen et al. (2013). CD36 is important for adipocyte recruitment and affects lipolysis. *Obesity* (*Silver Spring*), 21, 2037-2045.

Wada, T., T. Nakashima, N. Hiroshi et J. M. Penninger (2006). RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med*, 12, 17-25.

Wang, J. M., J. S. Isenberg, T. R. Billiar et A. F. Chen (2013). Thrombospondin-1/CD36 pathway contributes to bone marrow-derived angiogenic cell dysfunction in type 1 diabetes via Sonic hedgehog pathway suppression. Am J Physiol Endocrinol Metab, 305, E1464-1472.

Wang, J., R. Liu, M. Hawkins, N. Barzilai et L. Rossetti (1998). A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature*, 393, 684-688.

Wang, S., Z. Sun, X. Zhang, Z. Li, M. Wu, W. Zhao, H. Wang, T. Chen, H. Yan et J. Zhu (2015). Wnt1 Positively Regulates CD36 Expression via TCF4 and PPAR-gamma in Macrophages. *Cell Physiol Biochem*, 35, 1289-1302.

Wang, X., Y. Song, J. Ren et X. Qu (2009). Knocking-down cyclin A(2) by siRNA suppresses apoptosis and switches differentiation pathways in K562 cells upon administration with doxorubicin. *PLoS One*, 4, e6665.

Westendorf, J. J., R. A. Kahler et T. M. Schroeder (2004). Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene*, 341, 19-39.

Whelan, F. J., C. J. Meehan, G. B. Golding, B. J. McConkey et D. M. Bowdish (2012). The evolution of the class A scavenger receptors. *BMC Evol Biol*, 12, 227.

WHO (1994). Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser*, 843, 1-129.

WHO (2003). Prevention and management of osteoporosis: report of a WHO scientific group. (Geneva, WHO), pp. 2.

Whyte, M. P. (1994). Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocr Rev*, 15, 439-461.

Wilkinson, K. et J. El Khoury (2012). Microglial scavenger receptors and their roles in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis*, 2012, 1-10.

Williams, G. A., K. E. Callon, M. Watson, J. L. Costa, Y. Ding, M. Dickinson, Y. Wang, D. Naot, I. R. Reid et J. Cornish (2011). Skeletal phenotype of the leptin receptor-deficient db/db mouse. *J Bone Miner Res*, 26, 1698-1709.

Woitge, H. W., M. J. Seibel et R. Ziegler (1996). Comparison of total and bonespecific alkaline phosphatase in patients with nonskeletal disorder or metabolic bone diseases. *Clin Chem*, 42, 1796-1804. Woo, M. S., X. Wang, J. V. Faustino, N. Derugin, M. F. Wendland, P. Zhou, C. Iadecola et Z. S. Vexler (2012). Genetic deletion of CD36 enhances injury after acute neonatal stroke. *Ann Neurol*, 72, 961-970.

Won, W. J., M. F. Bachmann et J. F. Kearney (2008). CD36 is differentially expressed on B cell subsets during development and in responses to antigen. *J Immunol*, 180, 230-237.

Xavier, C. P., M. Melikova, Y. Chuman, A. Uren, B. Baljinnyam et J. S. Rubin (2014). Secreted Frizzled-related protein potentiation versus inhibition of Wnt3a/beta-catenin signaling. *Cell Signal*, 26, 94-101.

Yadav, V. K. et G. Karsenty (2009). Leptin-dependent co-regulation of bone and energy metabolism. *Aging*, 1, 954-956.

Yamaguchi, T., T. Sugimoto, S. Yano, M. Yamauchi, H. Sowa, Q. Chen et K. Chihara (2002). Plasma lipids in osteoporosis in postmenopausal women. *Endocrinology*, 49, 211–217.

Yamamoto, N., N. Akamatsu, H. Sakuraba, H. Yamazaki et K. Tanoue (1994). Platelet glycoprotein IV (CD36) deficiency is associated with the absence (type I) or the presence (type II) of glycoprotein IV on monocytes. *Blood*, 83, 392-397.

Yamamoto, N., H. Ikeda, N. N. Tandon, J. Herman, Y. Tomiyama, T. Mitani, S. Sekiguchi, R. Lipsky, U. Kralisz et G. A. Jamieson (1990). A platelet membrane glycoprotein (GP) deficiency in healthy blood donors: Naka- platelets lack detectable GPIV (CD36). *Blood*, 76, 1698-1703.

Yamazaki, H., A. Handa, M. Nishi, T. Tokunaga, M. Tomisawa, H. Hatanaka, Y. Abe, H. Kijima, Y. Ueyama et M. Nakamura (2004). Ribozyme mediated down-regulation of thrombospondin receptor CD36 inhibits the growth of the human osteosarcoma cell line. *Oncol Rep*, 11, 371-374.

Yan, Y., D. Tang, M. Chen, J. Huang, R. Xie, J. H. Jonason, X. Tan, W. Hou, D. Reynolds, W. Hsu et al. (2009). Axin2 controls bone remodeling through the beta-catenin-BMP signaling pathway in adult mice. *J Cell Sci*, 122, 3566-3578.

Yanai, H., H. Chiba, H. Fujiwara, M. Morimoto, K. Abe, S. Yoshida, Y. Takahashi, H. Fuda, S. P. Hui, H. Akita et al. (2000). Phenotype-genotype correlation in CD36 deficiency types I and II. *Thromb Haemost*, 84, 436-441.

Yang, Y., M. Chen, T. J. Loux et C. M. Harmon (2007). Regulation of FAT/CD36 mRNA gene expression by long chain fatty acids in the differentiated 3T3-L1 cells. *Pediatr Surg Int*, 23, 675-683.

Yao, G. Q., J. J. Wu, N. Troiano et K. Insogna (2011). Targeted overexpression of Dkk1 in osteoblasts reduces bone mass but does not impair the anabolic response to intermittent PTH treatment in mice. *J Bone Miner Metab*, 29, 141-148.

Yao, Z., L. Xing, C. Qin, E. M. Schwarz et B. F. Boyce (2008). Osteoclast precursor interaction with bone matrix induces osteoclast formation directly by an interleukin-1-mediated autocrine mechanism. *J Biol Chem*, 283, 9917-9924.

Yesner, L. M., H. Y. Huh, S. F. Pearce et R. L. Silverstein (1996). Regulation of monocyte CD36 and thrombospondin-1 expression by soluble mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 16, 1019-1025.

Yin, W., E. Carballo-Jane, D. G. McLaren, V. H. Mendoza, K. Gagen, N. S. Geoghagen, L. A. McNamara, J. N. Gorski, G. J. Eiermann, A. Petrov et al. (2012). Plasma lipid profiling across species for the identification of optimal animal models of human dyslipidemia. *J Lipid Res*, 53, 51–65.

Yoshida, C. A., H. Yamamoto, T. Fujita, T. Furuichi, K. Ito, K. Inoue, K. Yamana, A. Zanma, K. Takada, Y. Ito et al. (2004). Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev*, 18, 952-963.

Yoshimoto, A. N., C. Bernardazzi, A. J. V. Carneiro, C. C. S. Elia, C. A. Martinusso, G. M. Ventura, M. T. L. Castelo-Branco et H. S. P. de Souza (2012). Hedgehog pathway signaling regulates human colon carcinoma HT-29 epithelial cell line apoptosis and cytokine secretion. *PLoS One*, 7, e45332.

Yoshimoto, R., Y. Fujita, A. Kakino, S. Iwamoto, T. Takaya et T. Sawamura (2011). The discovery of LOX-1, its ligands and clinical significance. *Cardiovasc Drugs Ther*, 25, 379-391.

Young, I.S. et J. McEneny (2001). Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. Biochem Soc Trans, 29, 358-362.

Young, M. F. (2003). Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporos Int*, 14, S35-42.

Yu, H. M., B. Jerchow, T. J. Sheu, B. Liu, F. Costantini, J. E. Puzas, W. Birchmeier et W. Hsu (2005). The role of Axin2 in calvarial morphogenesis and craniosynostosis. *Development*, 132, 1995-2005.

Yu, X. P. et S. Chandrasekhar (1997). Parathyroid hormone (PTH 1-34) regulation of rat osteocalcin gene transcription. *Endocrinology*, 138, 3085-3092.

Yuasa-Kawase, M., D. Masuda, T. Yamashita, R. Kawase, H. Nakaoka, M. Inagaki, K. Nakatani, K. Tsubakio-Yamamoto, T. Ohama, A. Matsuyama et al. (2012). Patients with CD36 deficiency are associated with enhanced atherosclerotic cardiovascular diseases. *J Atheroscler Thromb*, 19, 263-275.

Yue, P., Z. Chen, F. Nassir, C. Bernal-Mizrachi, B. Finck, S. Azhar et N. A. Abumrad (2010). Enhanced hepatic apoA-I secretion and peripheral efflux of cholesterol and phospholipid in CD36 null mice. *PLoS One*, 5, e9906.

Zelzer, E., D. J. Glotzer, C. Hartmann, D. Thomas, N. Fukai, S. Soker et B.R. Olsen (2001). Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/Runx2. *Mech Dev*, 106, 97–106.

Zhang, F., Y. Chen, M. Heiman et R. Dimarchi (2005). Leptin: structure, function and biology. *Vitam Horm*, 71, 345-372.

Zhang, J., W. Yang, D. Zhao, Y. Han, B. Liu, H. Zhao, H. Wang, Q. Zhang et G. Xu (2014). Correlation between TSP-1, TGF-beta and PPAR-gamma expression levels and glioma microvascular density. *Oncol Lett*, 7, 95-100.

Zhang, P., W. Li, Y. Wang, L. Hou, Y. Xing, H. Qin, J. Wang, Y. Liang et H. Han (2007). Identification of CD36 as a new surface marker of marginal zone B cells by transcriptomic analysis. *Mol Immunol*, 44, 332-337.

Zhang, R., B. O. Oyajobi, S. E. Harris, D. Chen, C. Tsao, H. W. Deng et M. Zhao (2013). Wnt/beta-catenin signaling activates bone morphogenetic protein 2 expression in osteoblasts. *Bone*, 52, 145-156.

Zhang, X., R. L. Fitzsimmons, L. G. Cleland, P. L. Ey, A. C. Zannettino, E. A. Farmer, P. Sincock et G. Mayrhofer (2003). CD36/fatty acid translocase in rats: distribution, isolation from hepatocytes, and comparison with the scavenger receptor SR-B1. *Lab Invest*, 83, 317-332.

Zhang, X. J., L.H. Zhou, X. Ban, D. X. Liu, W. Jiang et X. M. Liu (2011). Decreased expression of CD36 in circumvallate taste buds of high-fat diet induced obese rats. *Acta Histochem*, 113, 663-667.

Zhang, Y. H., A. Heulsmann, M. M. Tondravi, A. Mukherjee et Y. Abu-Amer (2001). Tumor necrosis factor-alpha (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways. *J Biol Chem*, 276, 563-568.

Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold et J. L. Friedman (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372, 425-432.

Zhao, Z., M. Zhao, G. Xiao et R. T. Franceschi (2005). Gene transfer of the Runx2 transcription factor enhances osteogenic activity of bone marrow stromal cells in vitro and in vivo. *Mol Ther*, 12, 247-253.

Zhou, X., Z. Zhang, J. Q. Feng, V. M. Dusevich, K. Sinha, H. Zhang, B.G. Darnay et B. de Crombrugghe (2010). Multiple functions of Osterix are required for bone growth and homeostasis in postnatal mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107, 12919-12924.

Zhou, Z., M. Neupane, H. R. Zhou, D. Wu, C. C. Chang, N. Moustaid-Moussa et K. J. Claycombe (2012). Leptin differentially regulate STAT3 activation in ob/ob mouse adipose mesenchymal stem cells. *Nutr Metab (Lond)*, 9:109, 1-13.

Zuk, P. A., M. Zhu, P. Ashjian, D. A. De Ugarte, J. I. Huang, H. Mizuno, Z. C. Alfonso, J. K. Fraser, P. Benhaim et M. H. Hedrick (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 13, 4279-4295.

Zuryn, A., A. Grzanka, A. Stepien, D. Grzanka, R. Debski et D. Smolinski (2007). Expression of cyclin A in human leukemia cell line HL-60 following treatment with doxorubicin and etoposide: the potential involvement of cyclin A in apoptosis. *Oncol Rep*, 17, 1013-1019.