

Protéines SIBLING et Minéralisation

Luc Malaval

LBTO

INSERM U1059/SAINBIOSE

Université Jean Monnet - COMUE Université de Lyon

F42023 Saint-Etienne



Régulation
hormonale

Facteurs locaux

Régulation
nerveuse

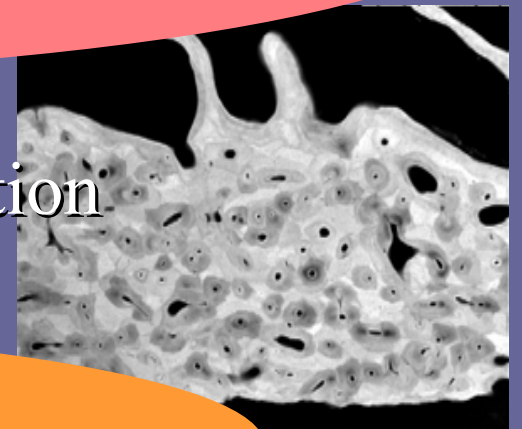
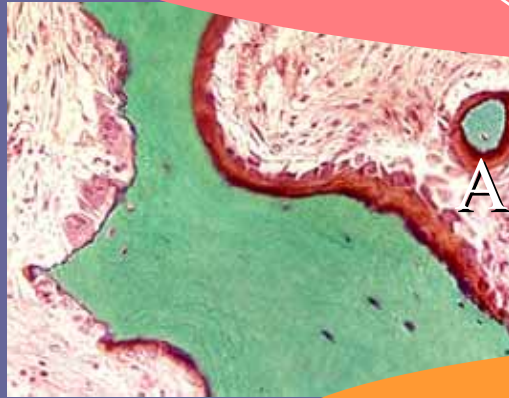
Remodelage

Composition/état de la
matrice extracellulaire

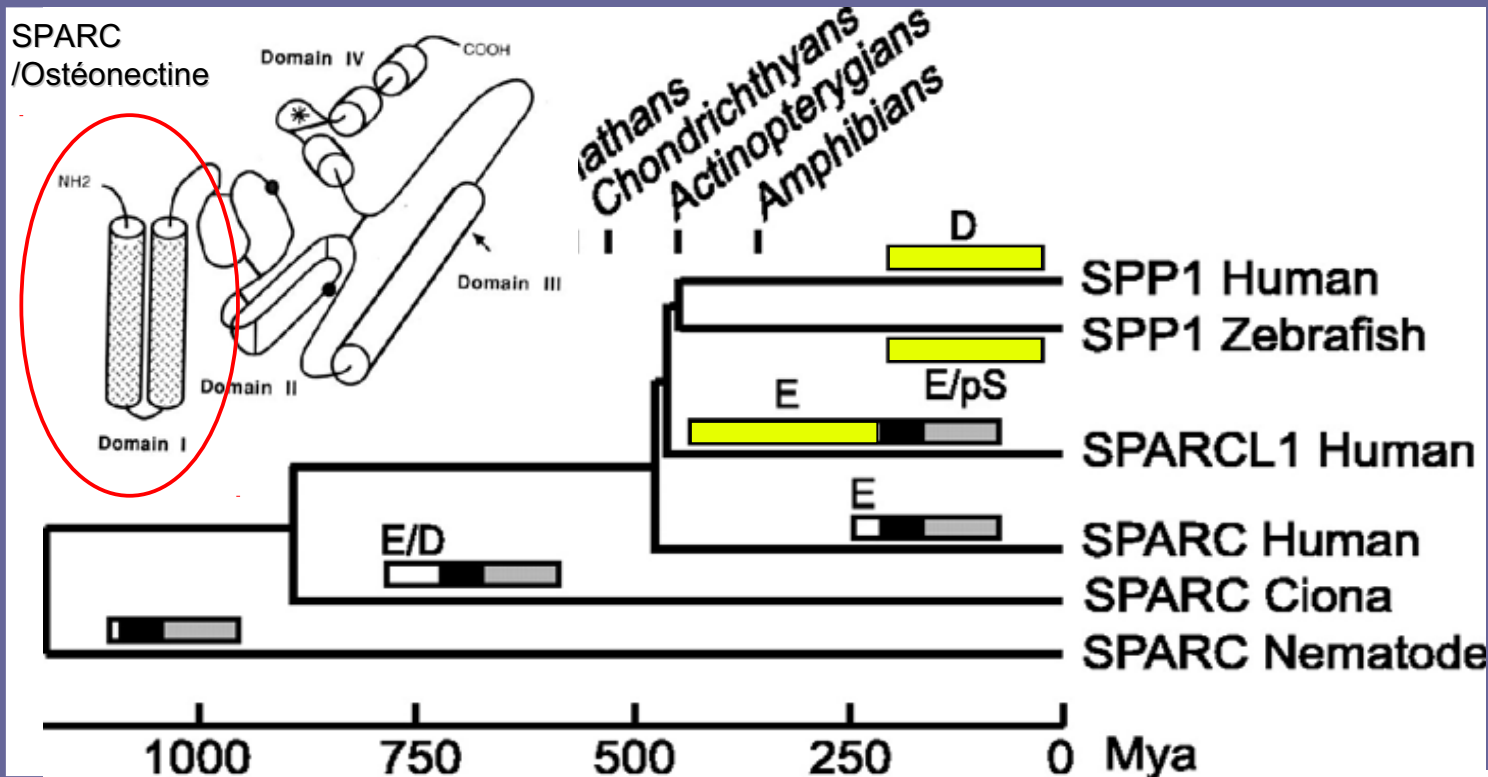
Architecture

Minéralisation

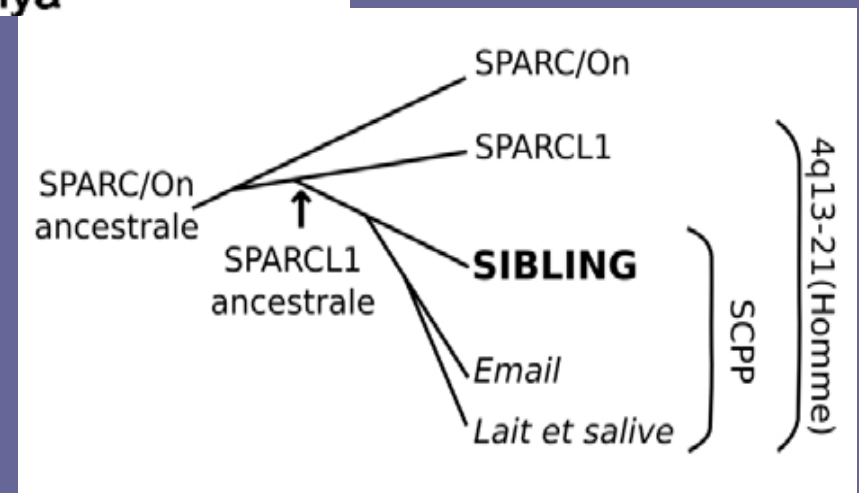
Résistance mécanique



SPARCL1/SC1/Hévine



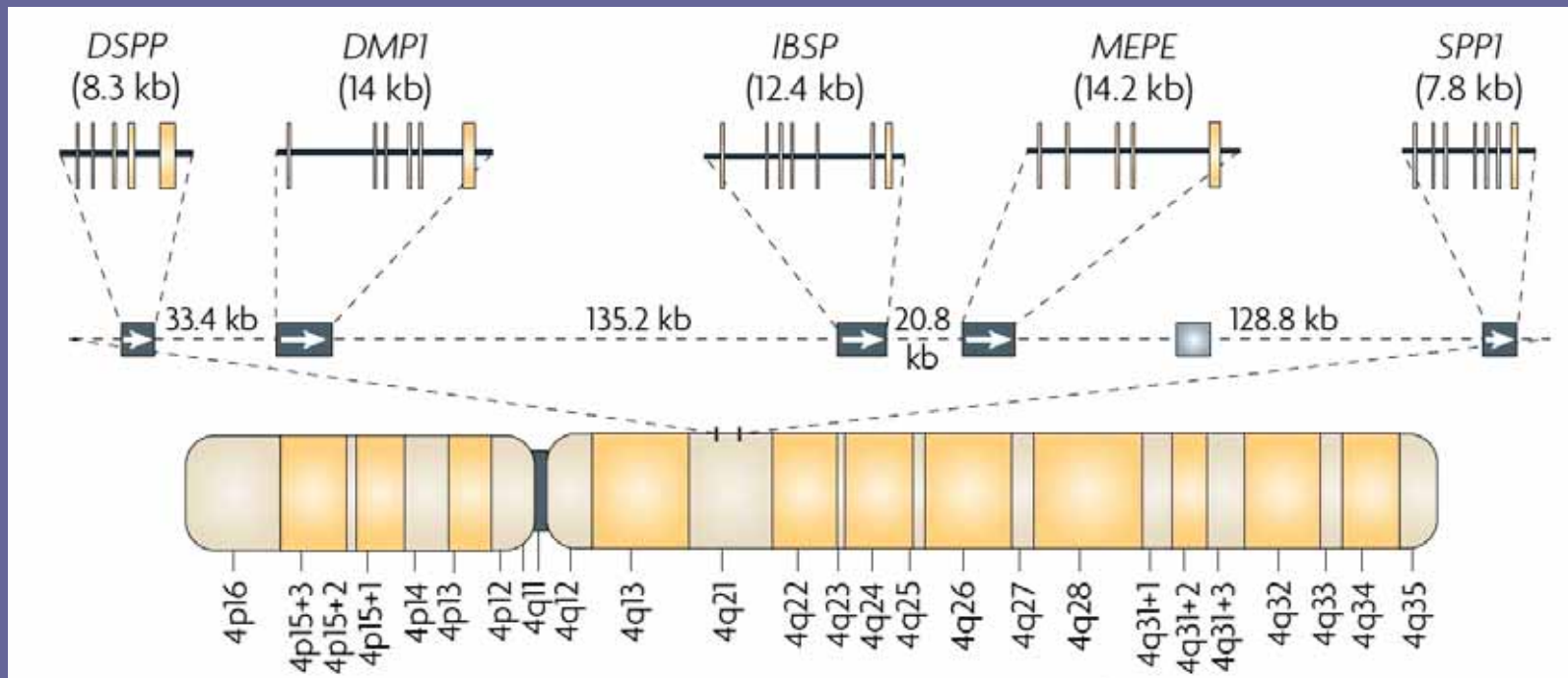
Le domaine N-terminal, long et riche en acide aminés acides de la SPARCL1, est l'ancêtre de plusieurs familles de "Secretory Calcium-binding PhosphoProteins" apparues successivement au cours de l'évolution des vertébrés



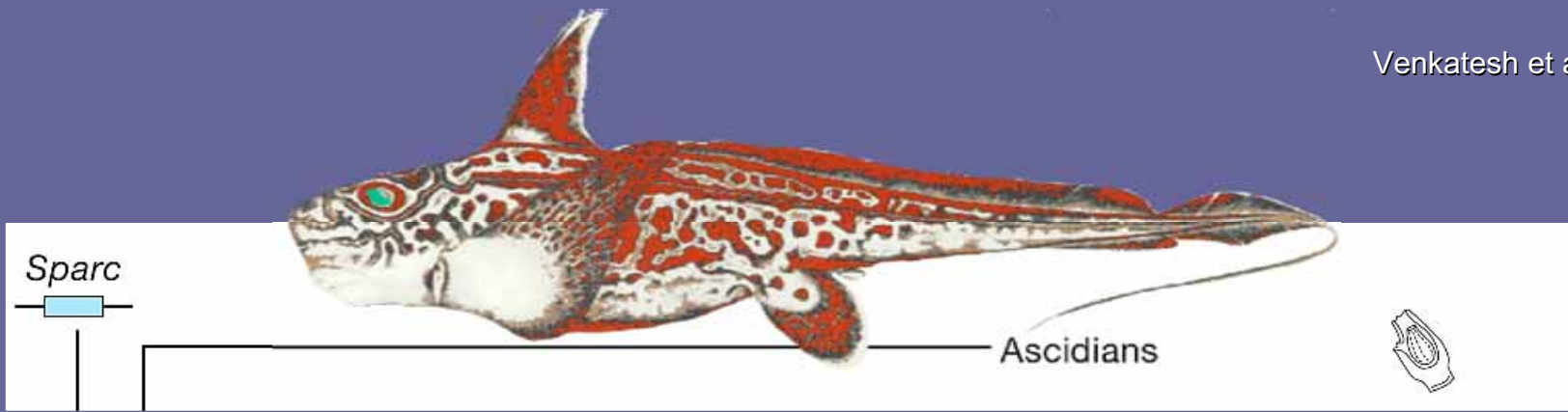
SIBLING

« **S**mall **I**ntegrin-**B**inding **L**igand, **N**-Linked **G**lycoproteins »

Localisées dans un «Bone Gene Cluster »
sur le chromosome 4 (4q21) chez l'humain, 5 chez la souris.

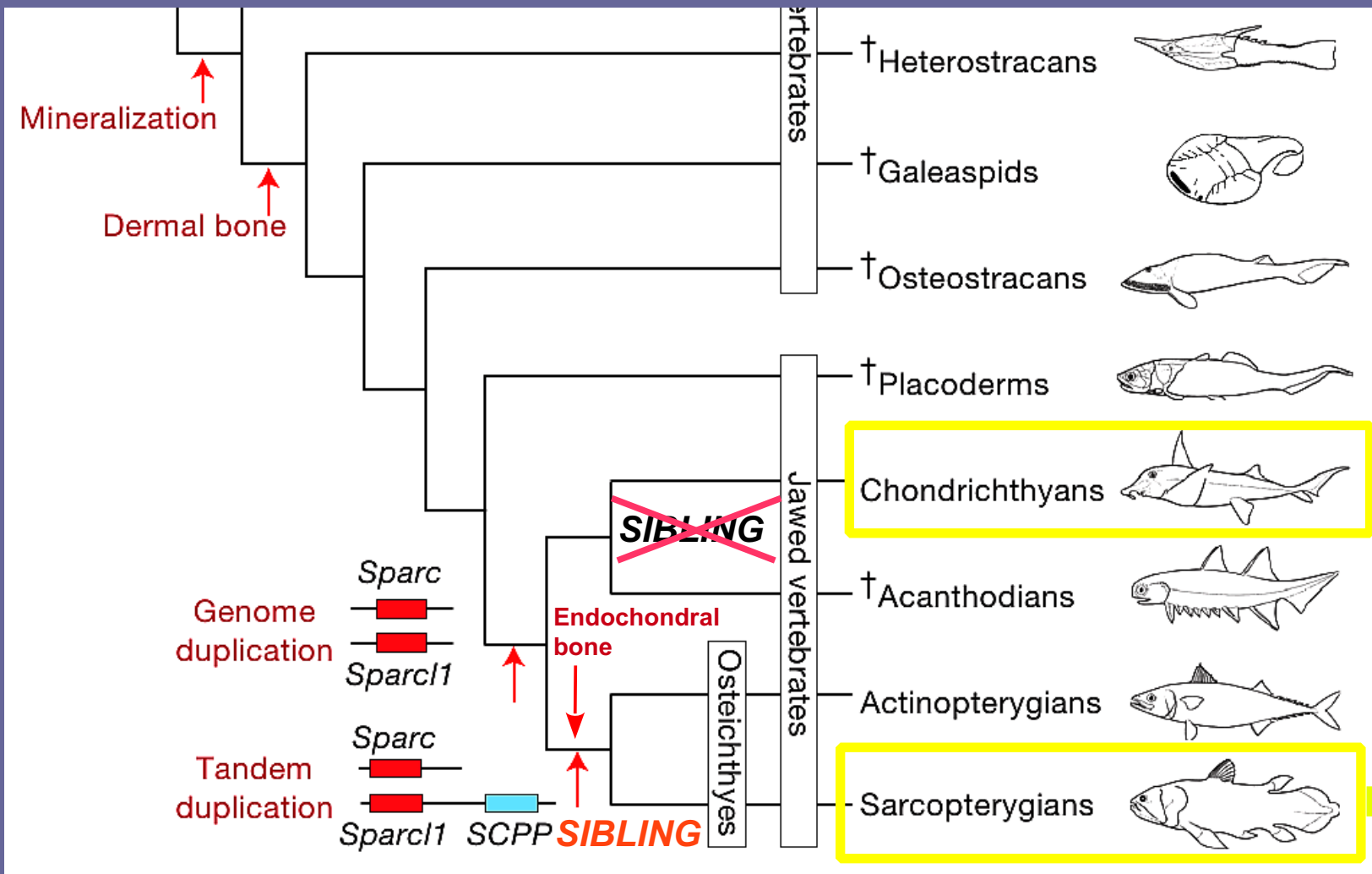


Belancène et al., Nature reviews, 2008, 8:212



L'apparition des SIBLING au cours de l'évolution coïncide avec l'invention de l'os endochondral !

Mais elles sont également exprimées dans de nombreux autres tissus (rein, glandes..)

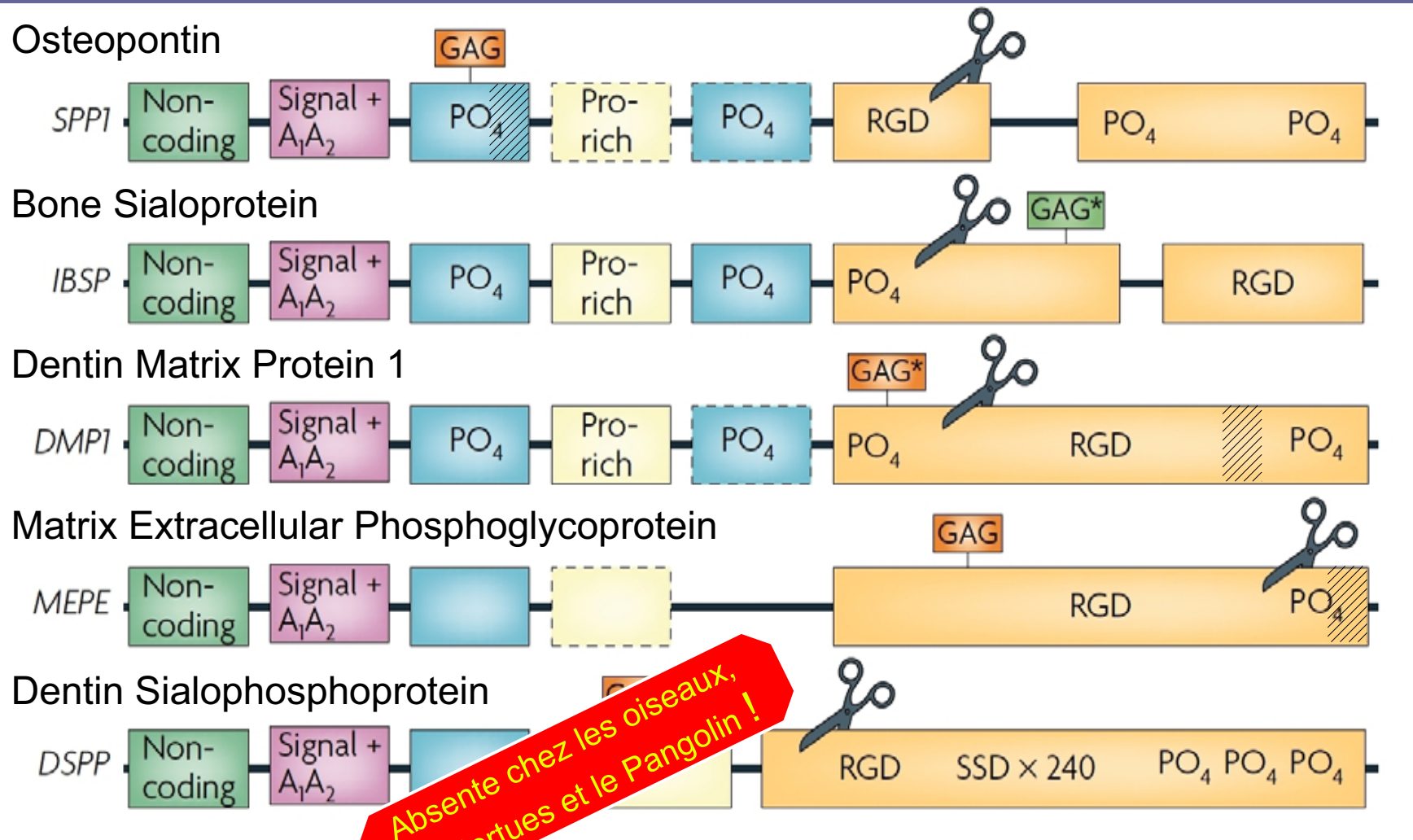


→ Tétrapodes

Les protéines SIBLING

PAS de pont disulfure, structure « flexible », AA acides, phosphorylations/sulfatations, glycosylations

Bellahcène et al., Nature reviews, 2008, 8:212



ASARM : 
 Inhibiteur de la minéralisation

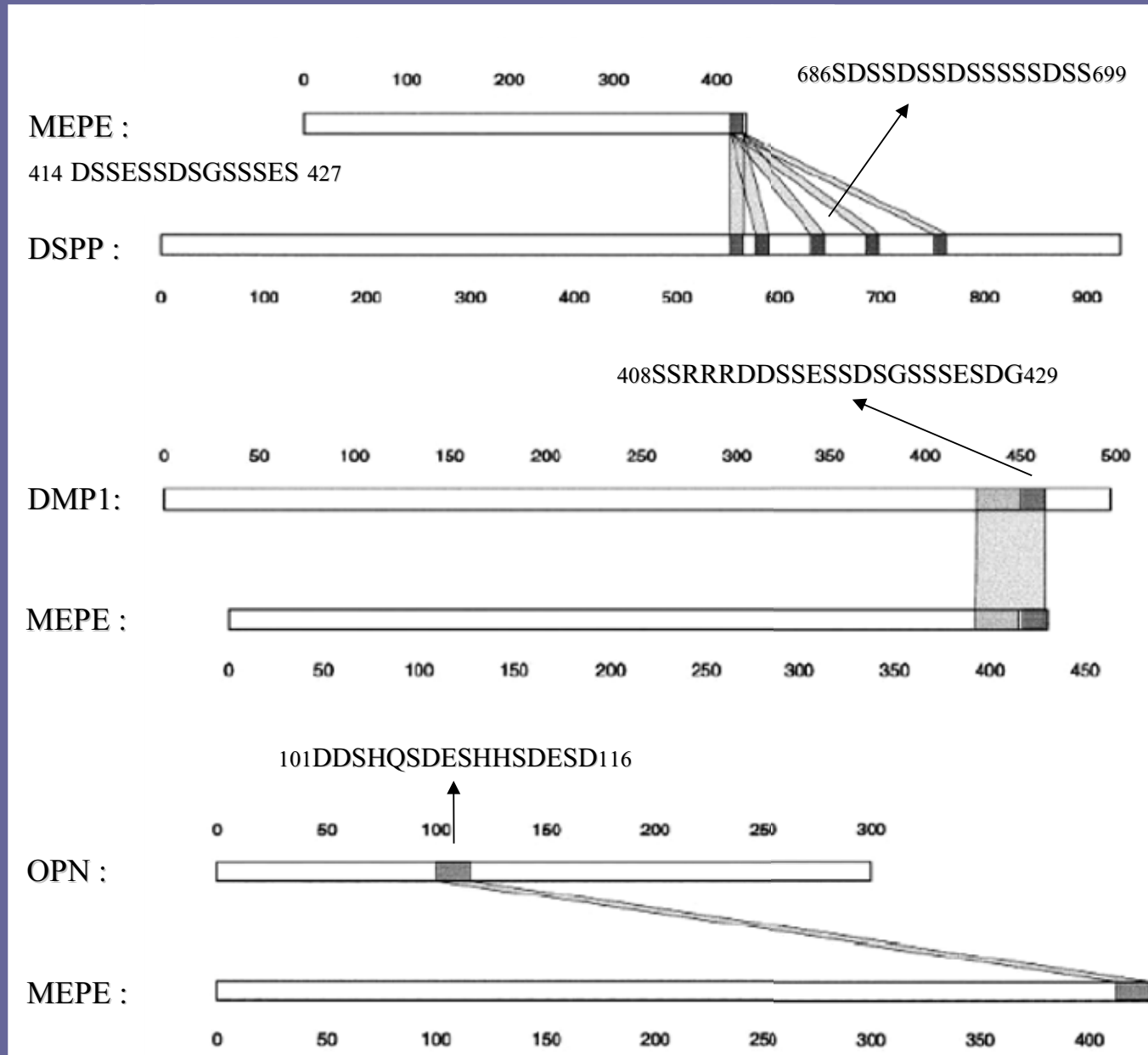
RGD: Arg-Gly-Asp
 séquence d'attachement d'intégrines

Absente chez les oiseaux, les tortues et le Pangolin !

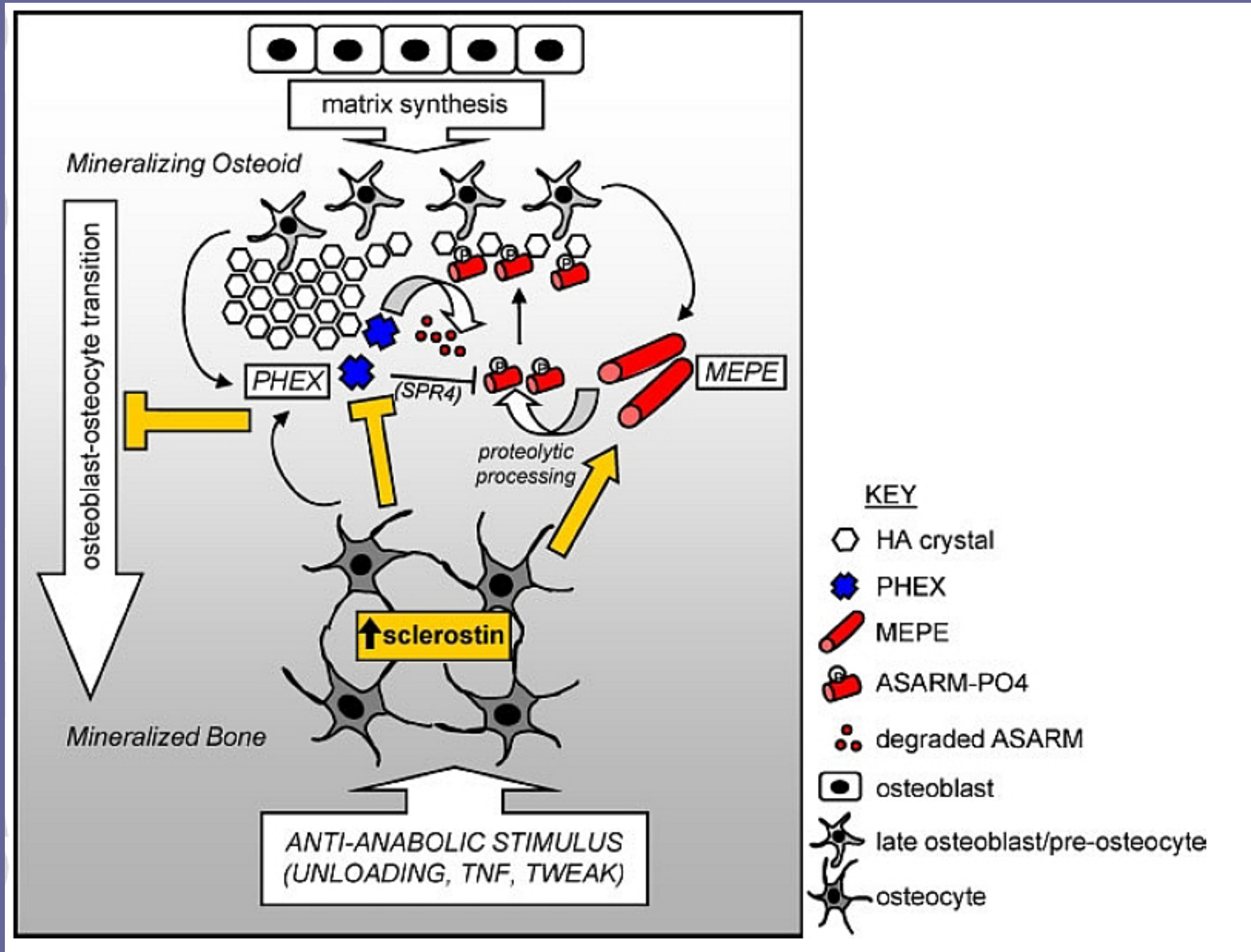
Forte affinité pour les structures cristallines (HAP)

La séquence, la structure et le schéma d'expression des SIBLING les positionnent à l'interface entre le minéral et les cellules osseuses, dans une excellente situation pour réguler à la fois des activités cellulaires (ostéogenèse/modélage/remodelage) et la réponse matricielle (minéralisation...)

Motif ASARM* → Inhibition de la minéralisation



*: « Acidic Serine-Aspartate Rich MEPE associated »



OF45/MEPE*/Ostéoréguline

*: « **M**atrix **E**xtracellular **P**hosphoglycoprot**E**in »

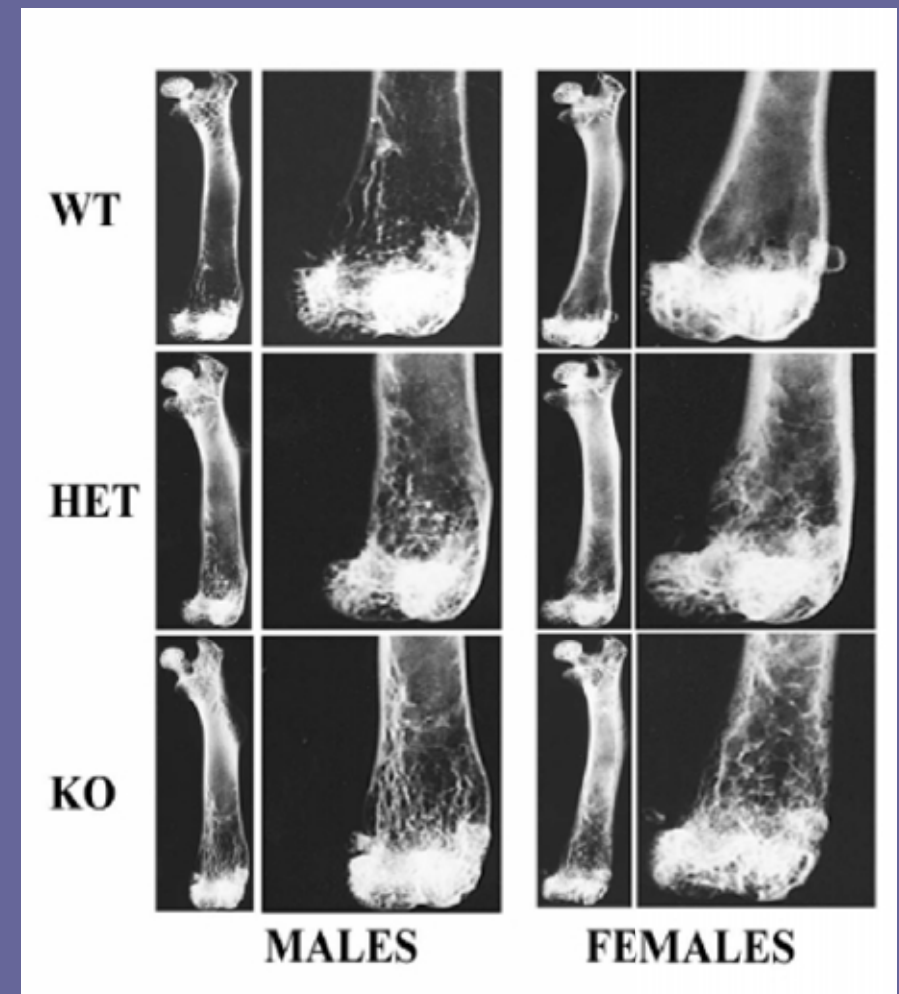
- 45~kD, Pas acide
- Répandue dans divers tissus et tumeurs ostéomalaciques.
- Exprimée dans l'os (ostéocytes) et la dent, mais aussi ailleurs....

-> Inhibiteur de l'ostéof ormation

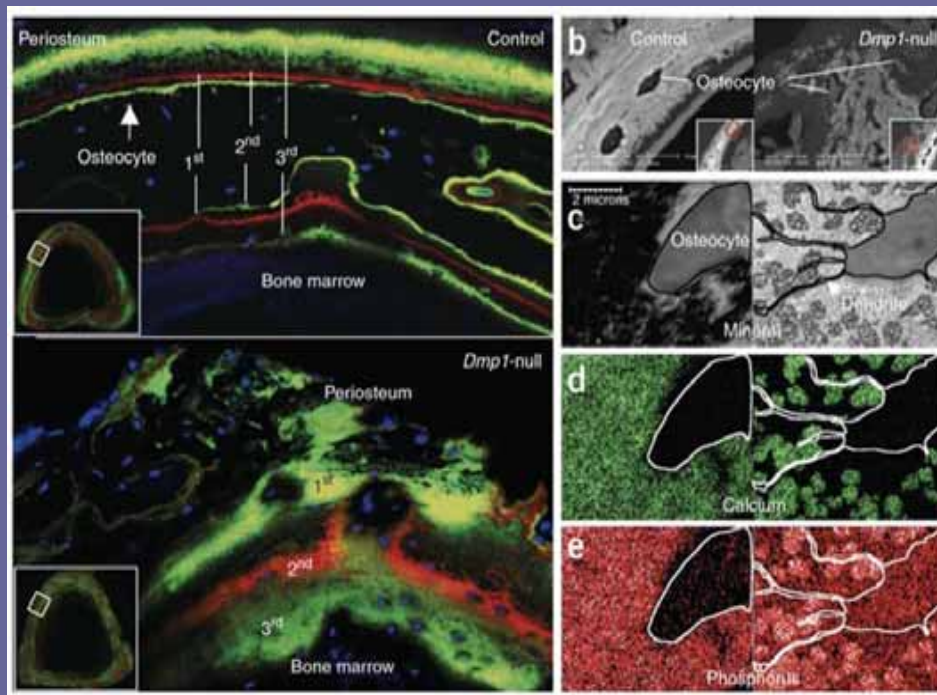


→ Augmentation du nombre de nodules formés.

Stimulation de la formation osseuse, pas d'effet sur la résorption.



DMP1*



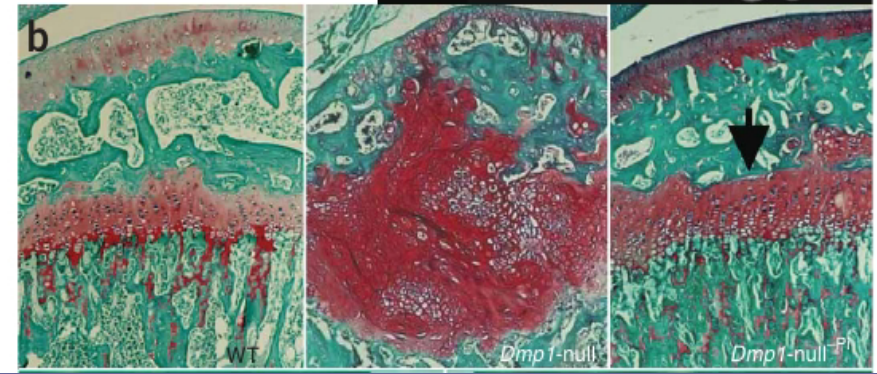
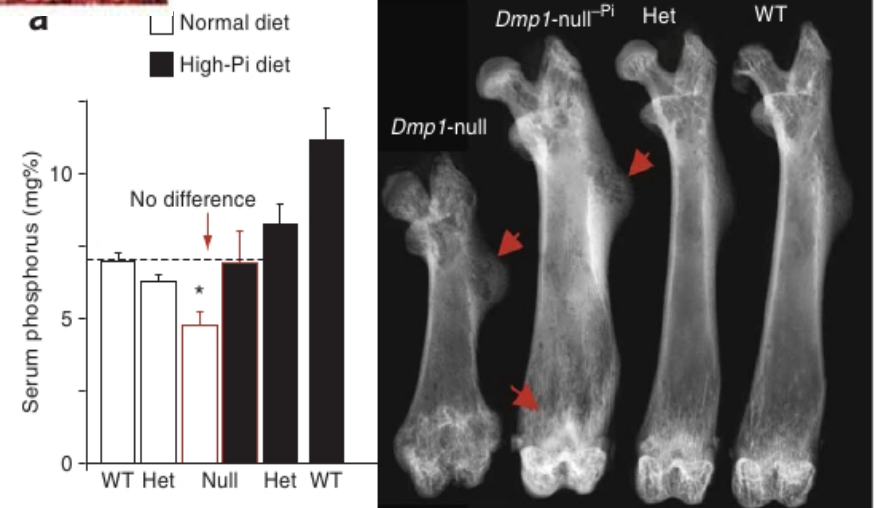
Feng et al., Nat Genet
2006 36:1310

Exprimée dans l'os (ostéocytes) et aussi ailleurs...

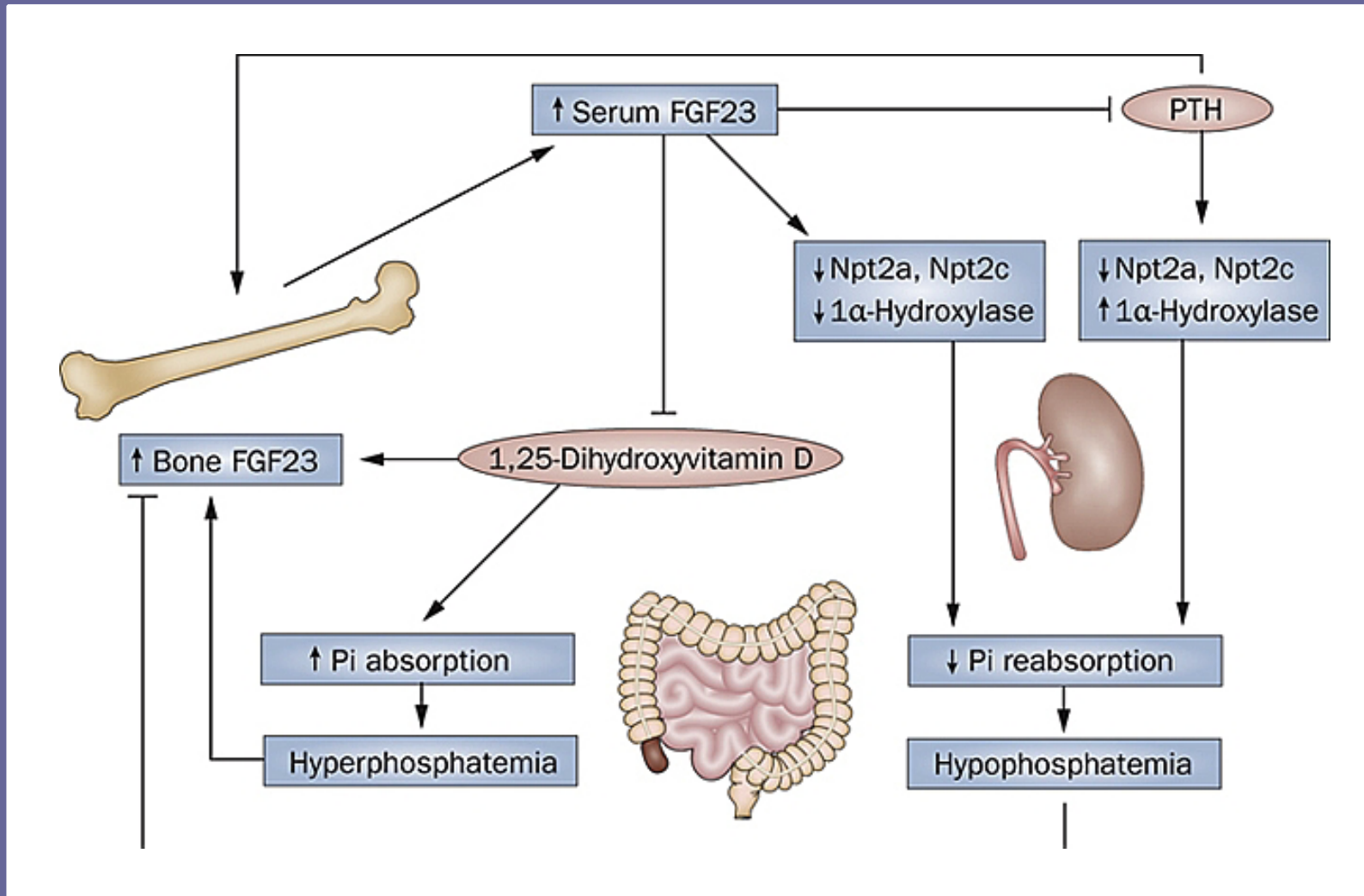
KO -> Très forte inhibition de la minéralisation!

... et rachitisme hypophosphatémique !

*: Dentin Matrix Protein 1



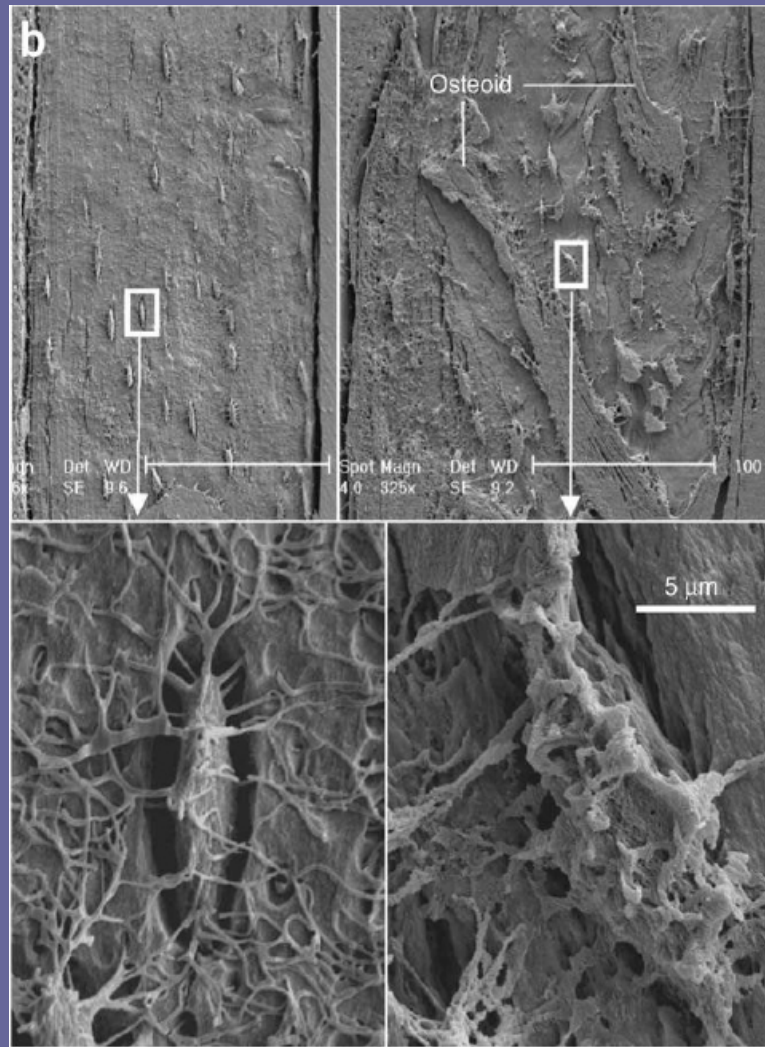
Régulation de la phosphorémie



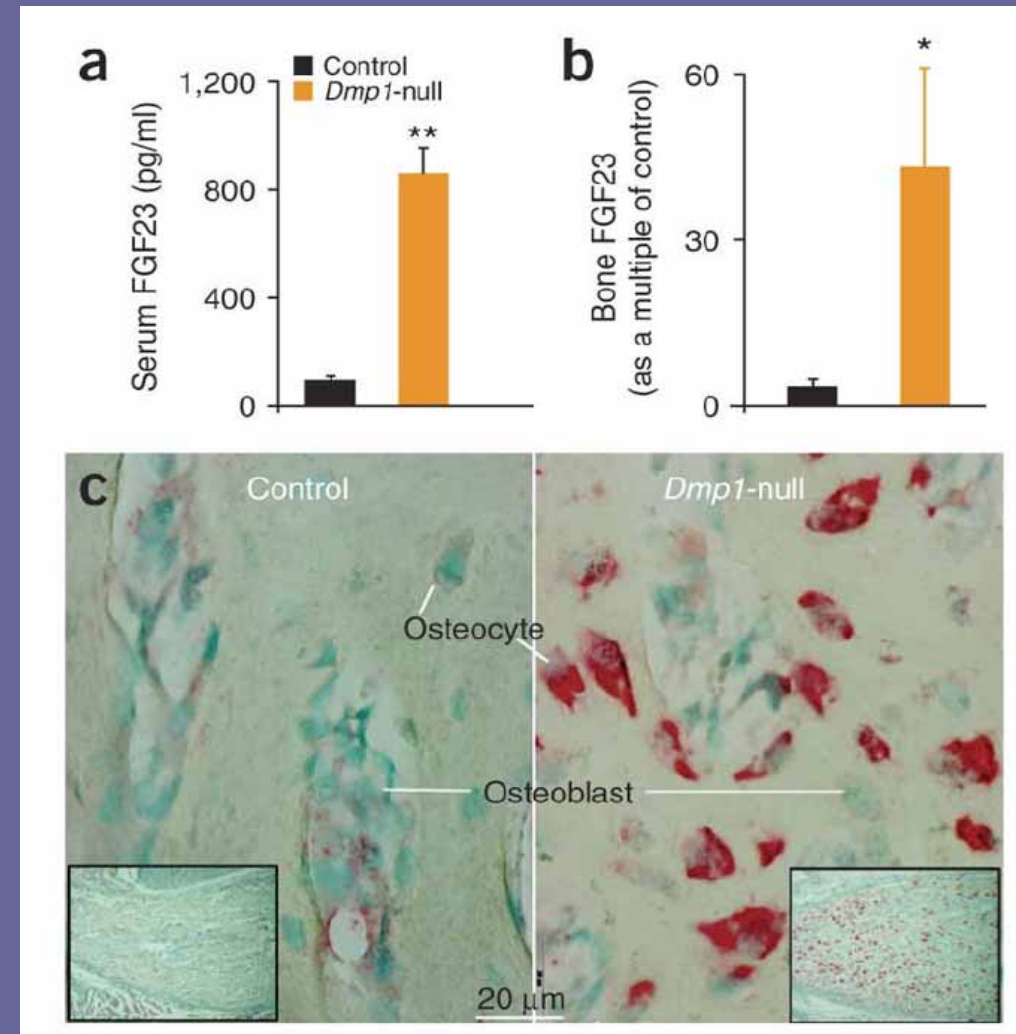
KO DMP1...

+/+

-/-

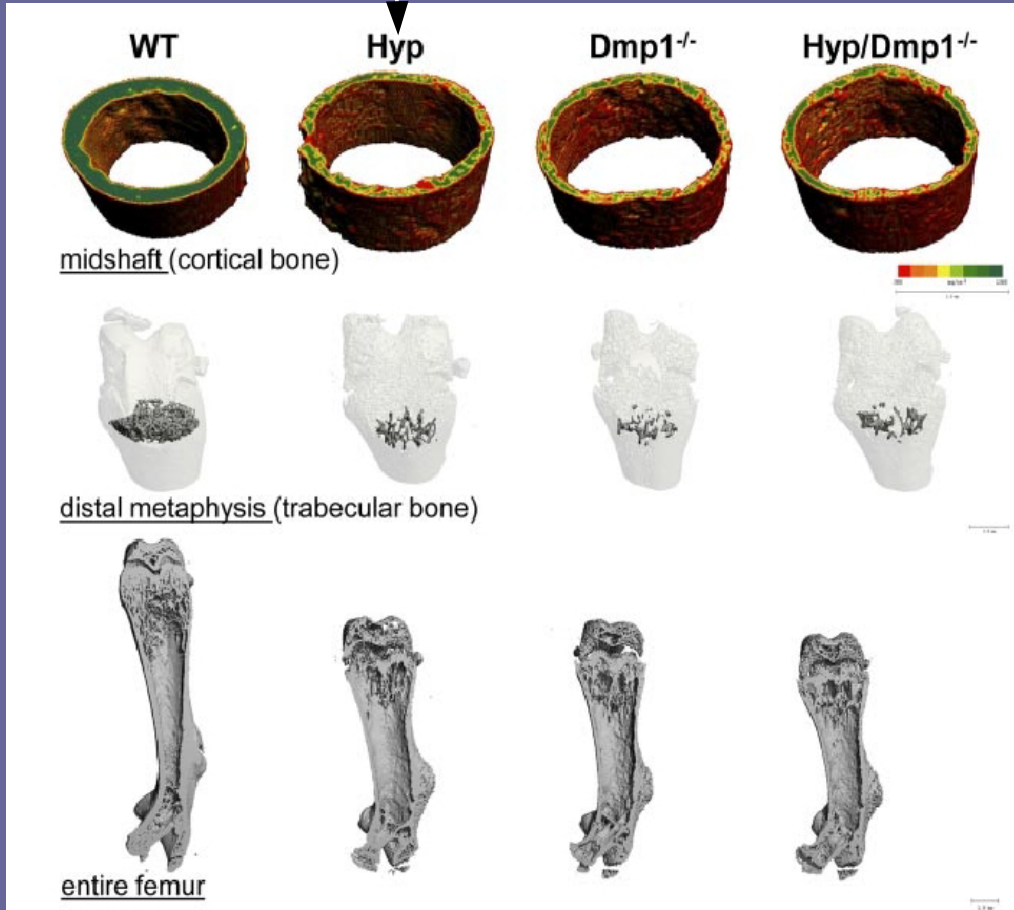


Transition ostéoblaste → ostéocyte
incomplète/défective

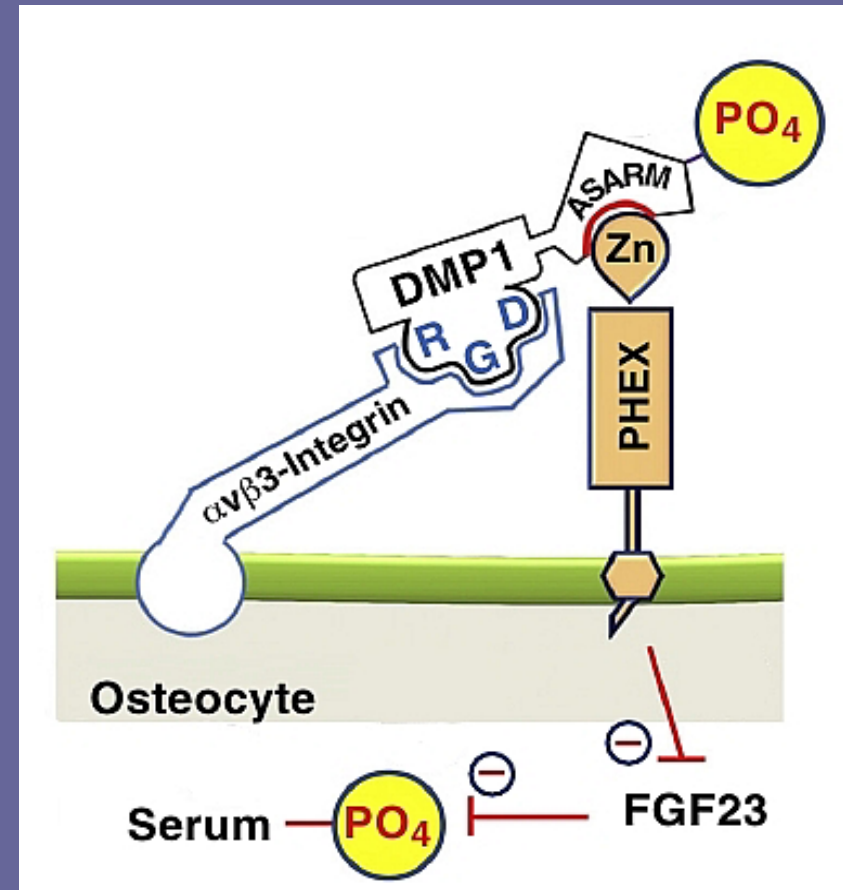


Surexpression du FGF23
→ Hypophosphatémie

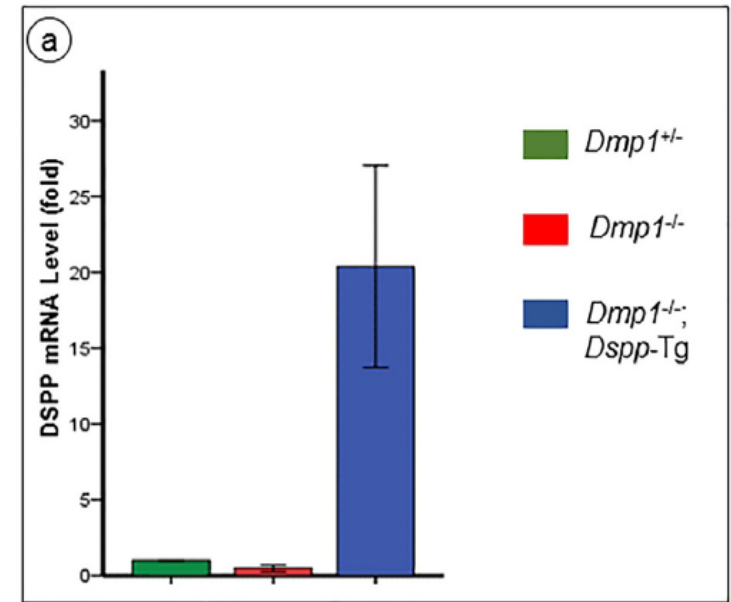
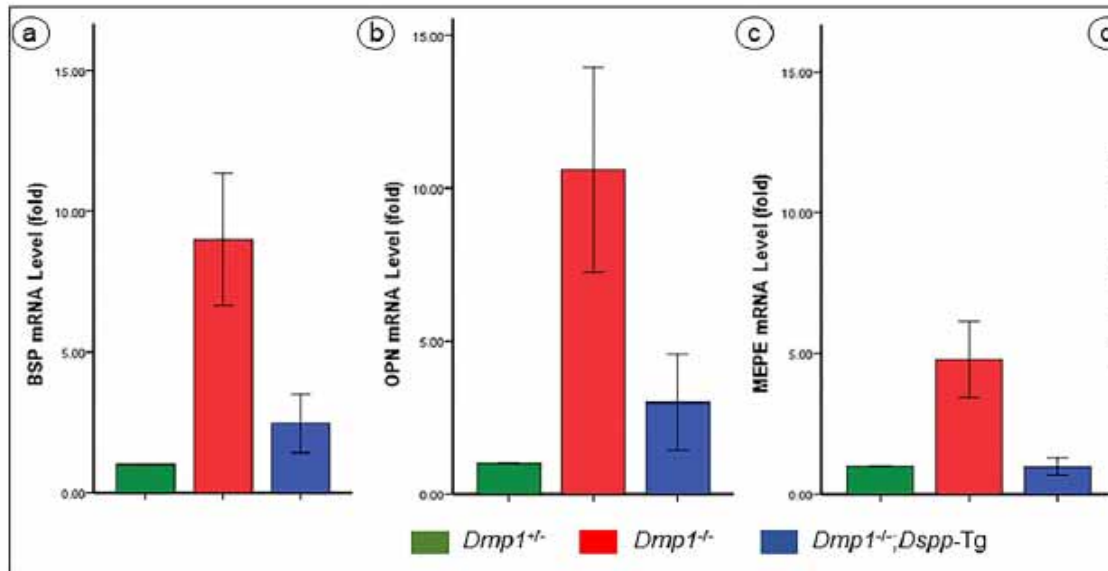
PHEX KO



Martin et al., FASEB J, 25:2551, 2011



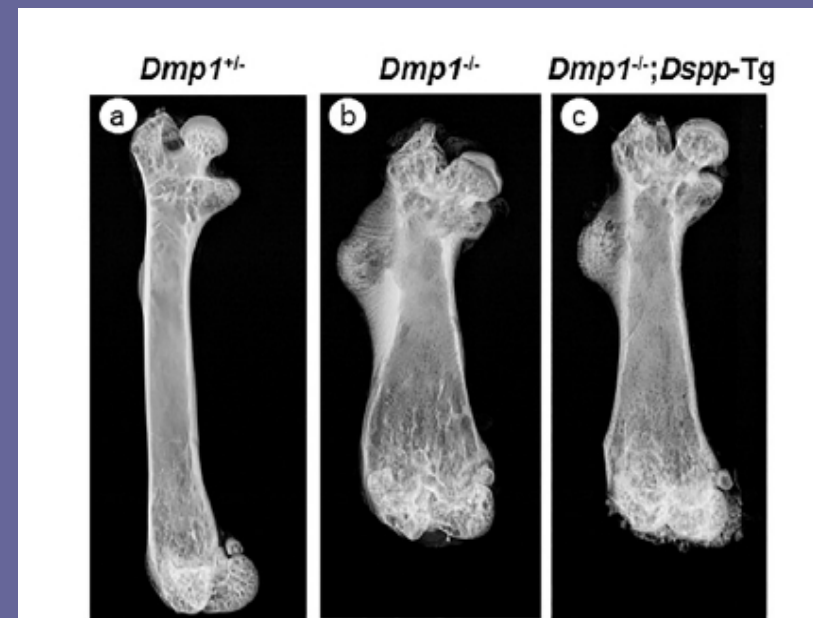
PHEX et DMP1 coopèrent pour réguler l'expression de FGF23



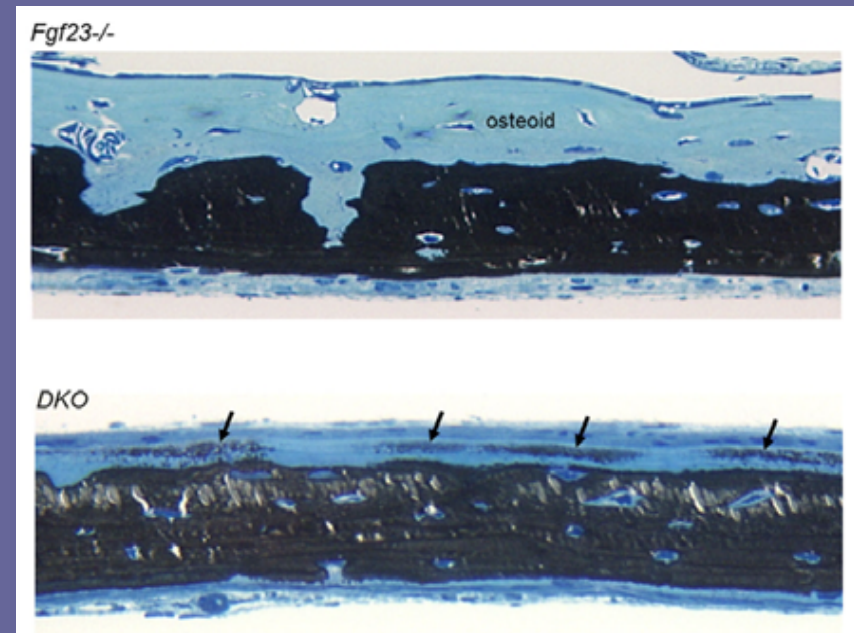
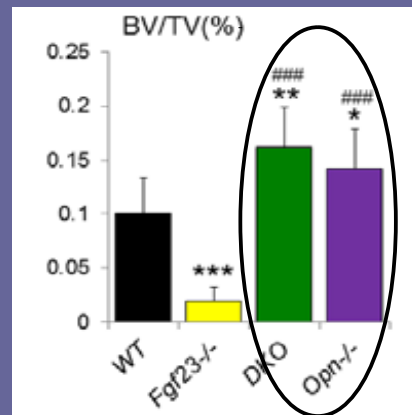
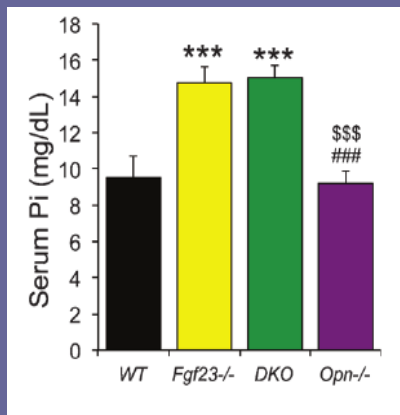
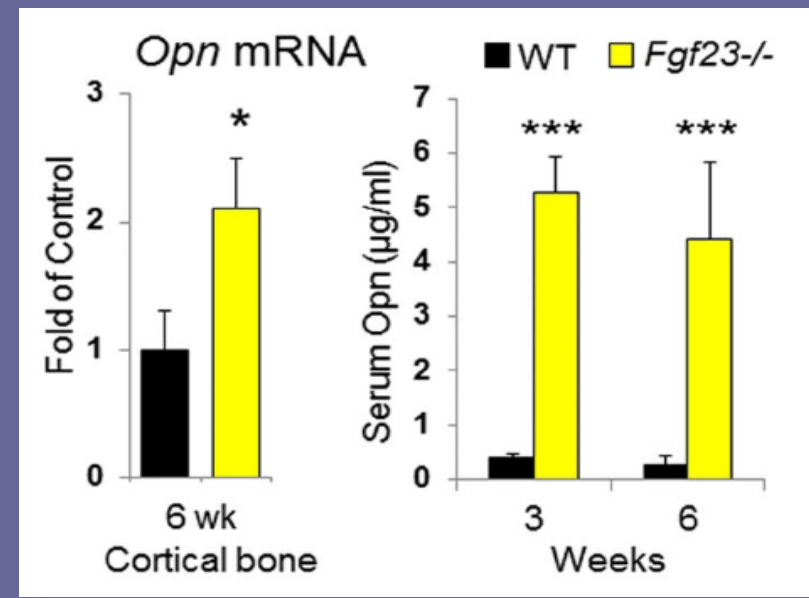
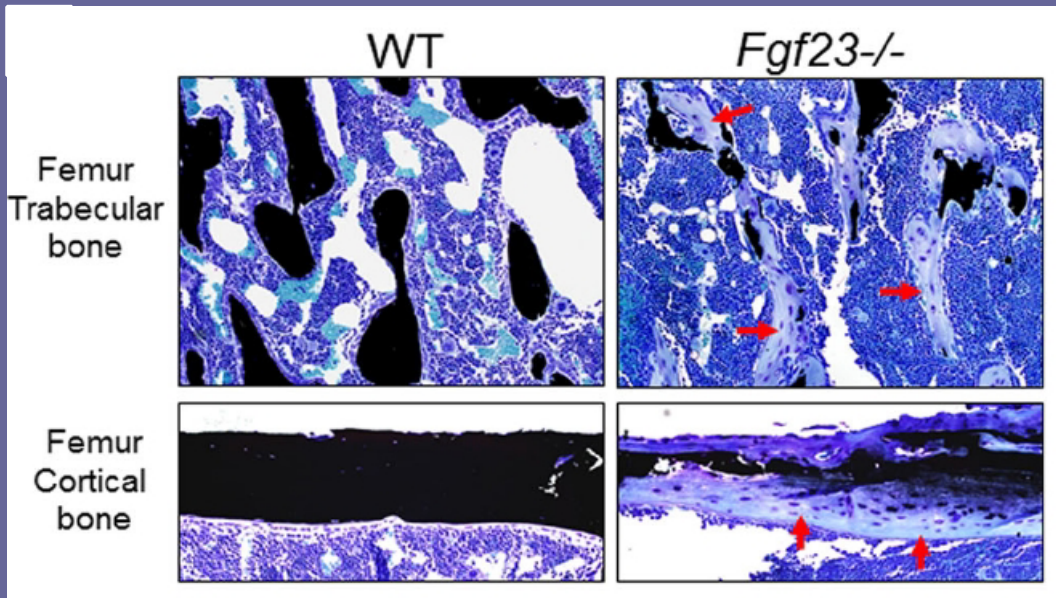
Le KO DMP1 augmente l'expression de TOUTES les autres SIBLING, qui est réduite dans les DMP1^{-/-}, Tg-DSPP...

... lesquelles sont toujours rachitique !

Exclusivité du rôle de la DMP1 dans la régulation de l'expression du FGF23 !



MEPE et la DMP1 sont deux régulateurs majeurs de la minéralisation et du métabolisme minéral, mais les autres SIBLINGs sont également impliquées dans ces mécanismes.



L'ostéopontine est un puissant inhibiteur de la minéralisation et de la formation osseuse.

Ostéopontine

(OPN, BSP-I, 44-kda Phosphoprotein, Eta1, 2ar, Pp69, SPP1)

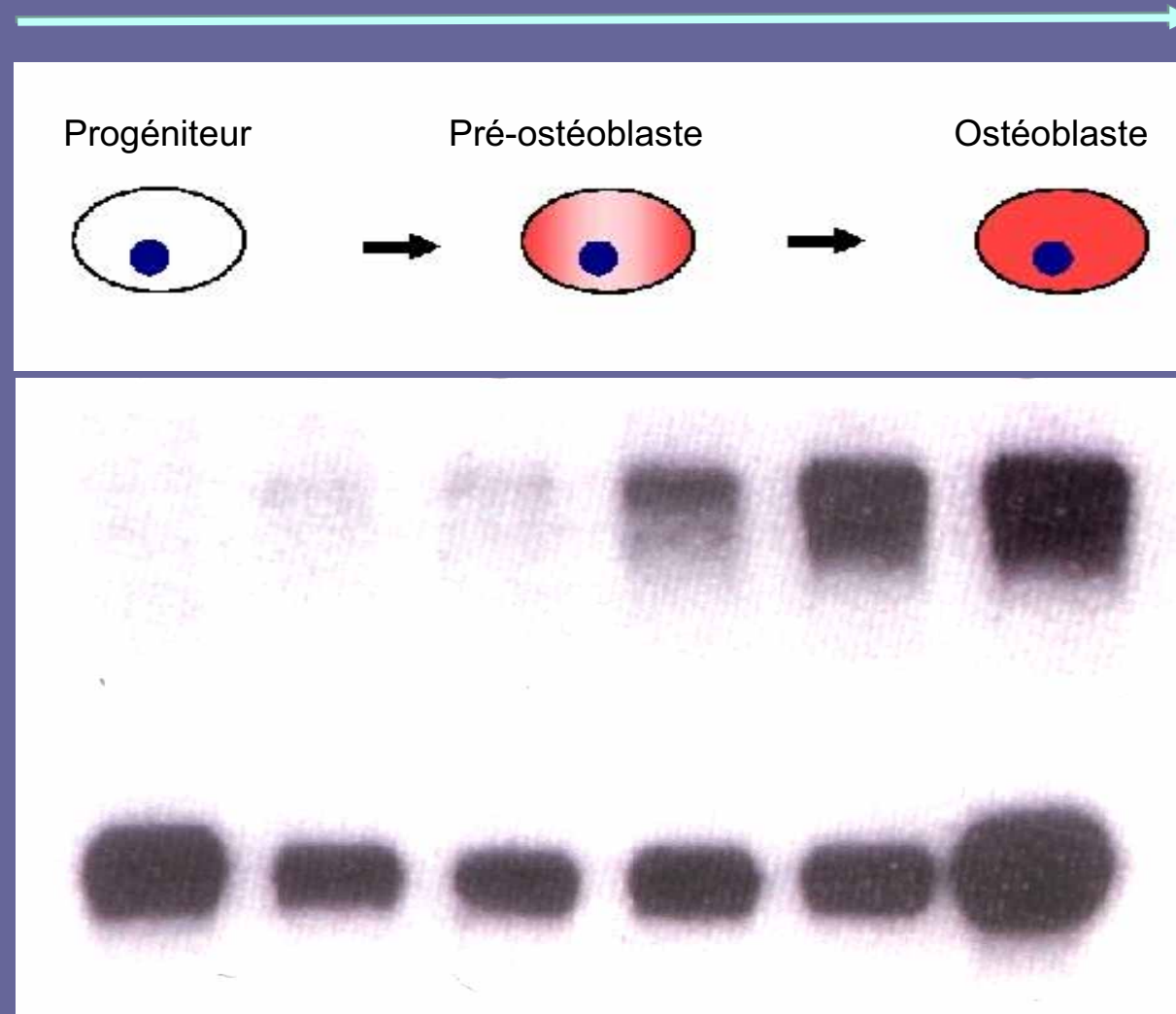
- › ~ 32 kDa.
- › Synthétisée par les ostéoblastes et les ostéoclastes
- › Ubiquitaire - sa quantité et son profil de modifications post-traductionnelles varient beaucoup en fonction des espèces et des tissus
- › A un profil de facteur matriciel, et aussi d'acteur paracrine (« cytokine »)

Sialoprotéine osseuse

(BSP, BSP-II, IBSP)

- › ~ 33kDa.
- › Très exprimée par les stades ostéoblastiques différenciés et par les ostéoclastes
- › Aussi trouvée dans un nombre croissant de tissus sains et cancéreux

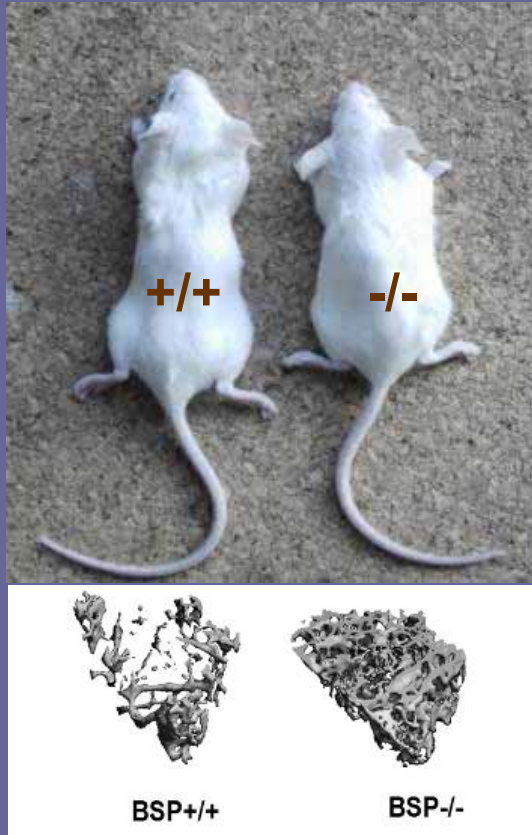
Différenciation ostéoblastique



L'OPN et la BSP sont toutes deux fortement exprimées par les ostéoblastes, avec des profils très différents

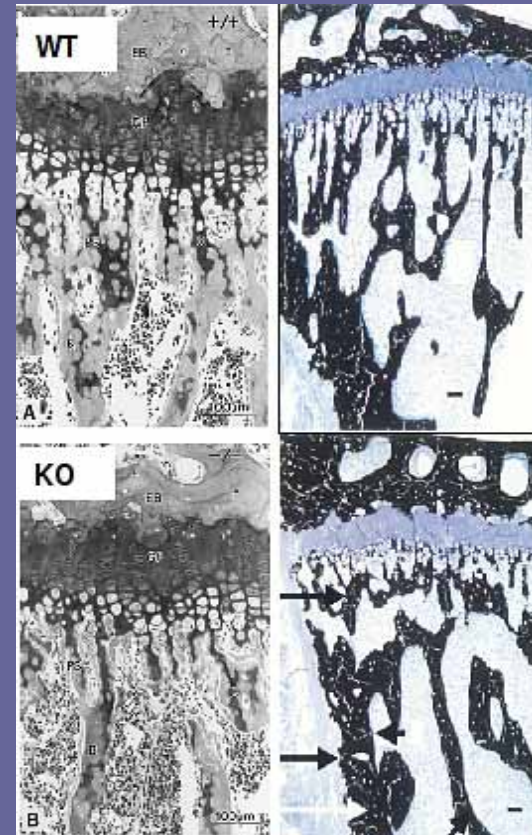
Extinctions géniques de l'OPN et la BSP: Phénotypes osseux

BSP-/-



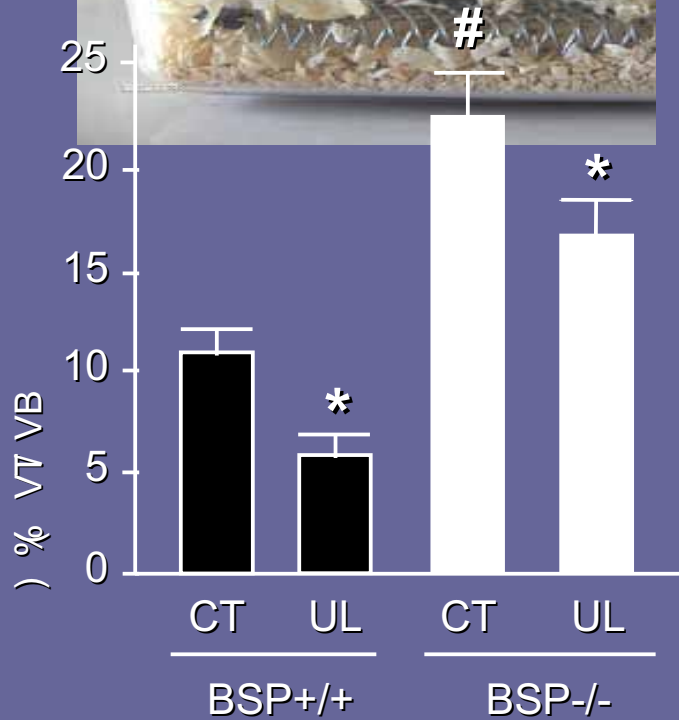
Moins d'ostéoblastes, et peu actifs
Moins d'ostéoclastes, et peu actifs
Faible remodelage, BV/TV élevé
chez l'adulte (4 mois)
Matrice hypominéralisée
(Malaval et al., 2008, JEM)

OPN-/-



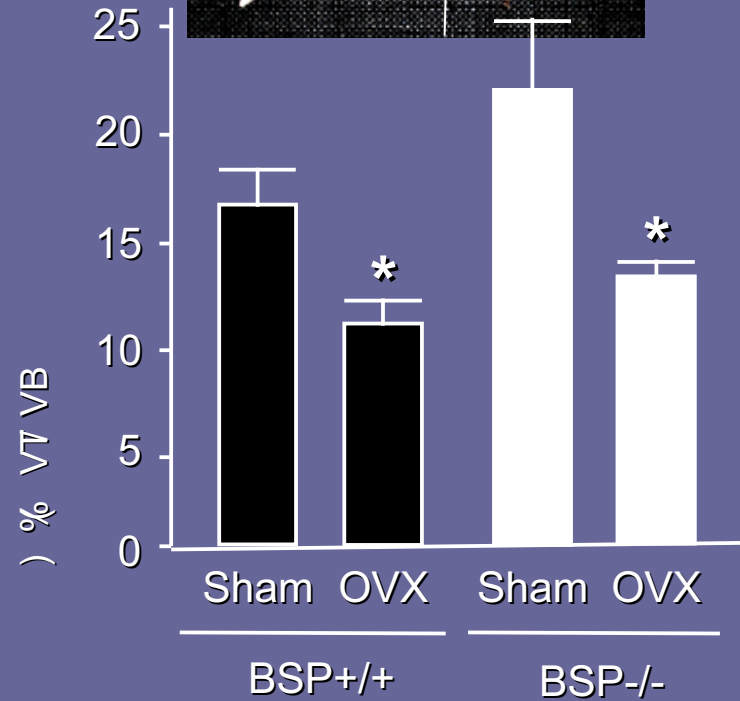
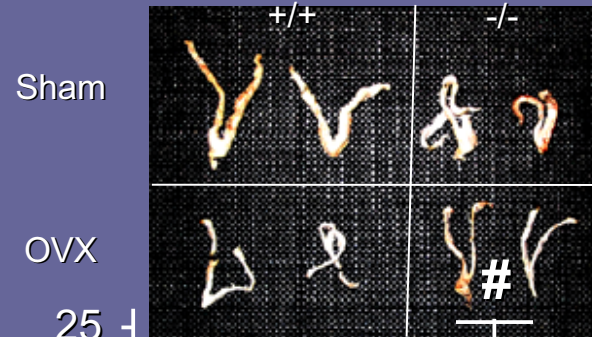
Plus d'ostéoclastes, mais peu actifs
Matrice hyperminéralisée
(Rittling et al., 1998, JBMR; Boskey et al., 2002, CTI)

Décharge



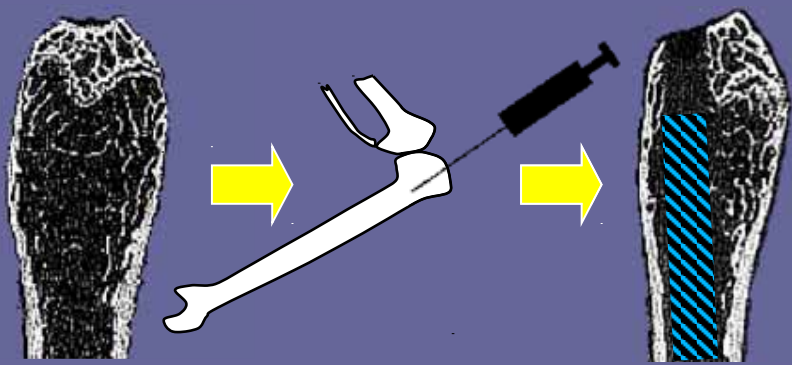
Malaval et al., J Exp Med, 205:1145, 2008

Ovariectomie PTHi

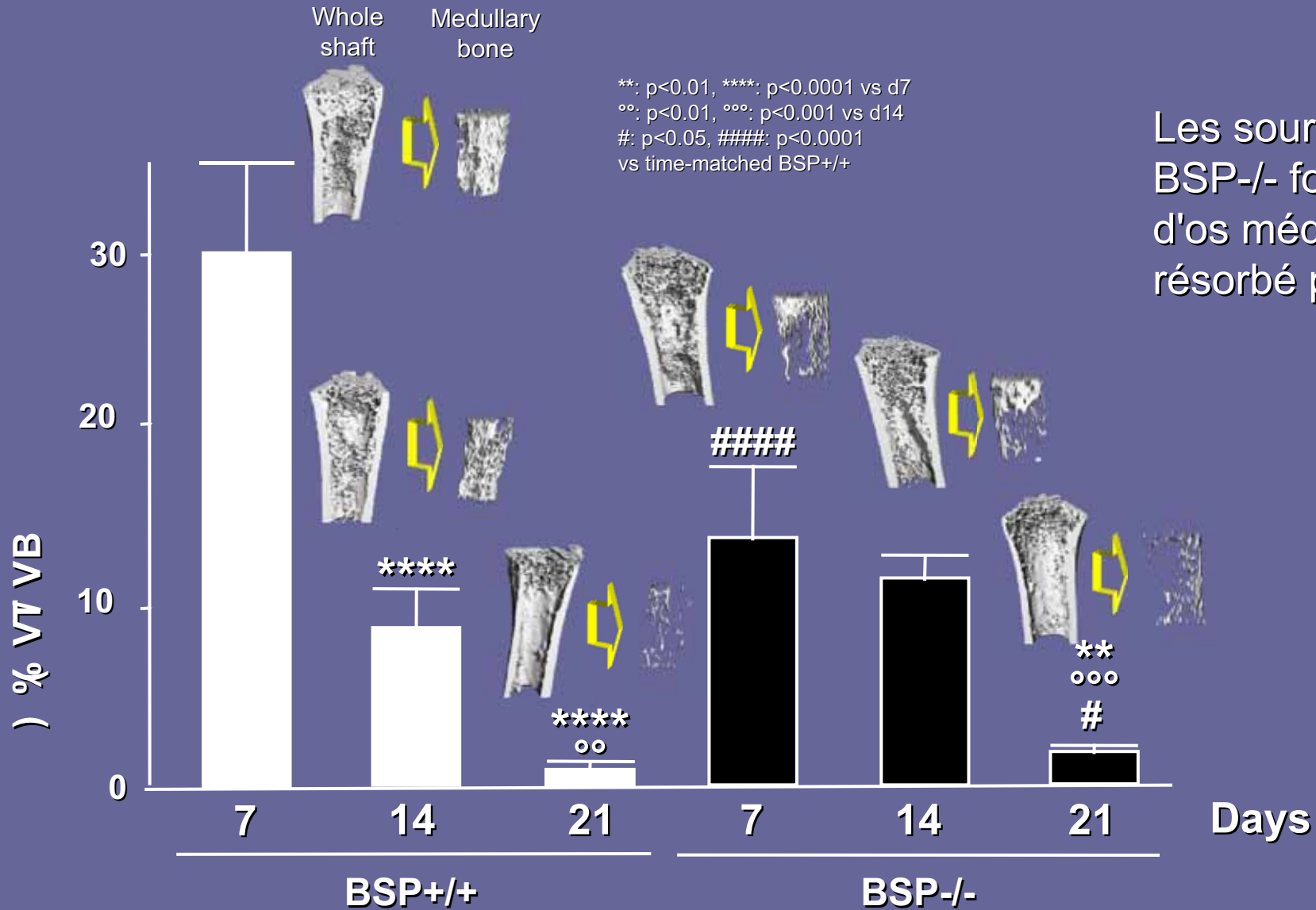


Wade-Gueye et al., Endocrinology, 151:5103, 2010

Au contraire des souris OPN^{-/-}, le squelette des BSP^{-/-} répond comme les souris sauvages au défaut de contrainte mécanique et aux défis hormonaux



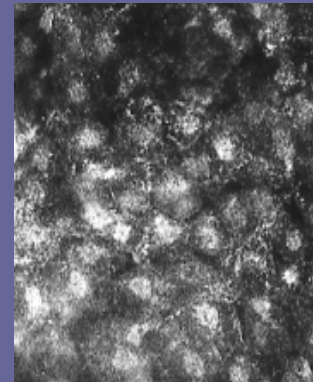
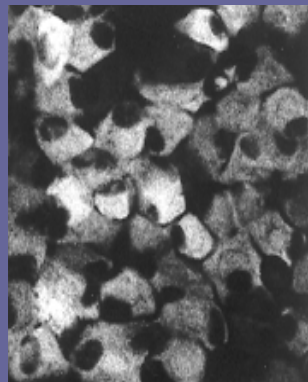
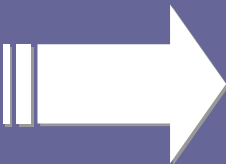
Ablation médullaire



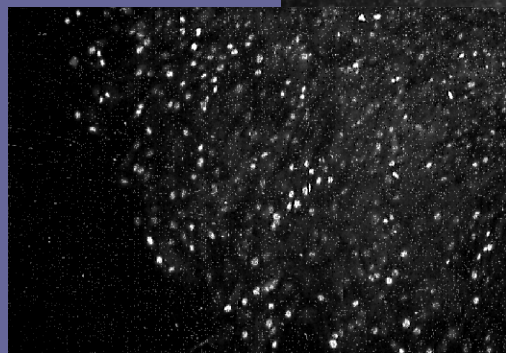
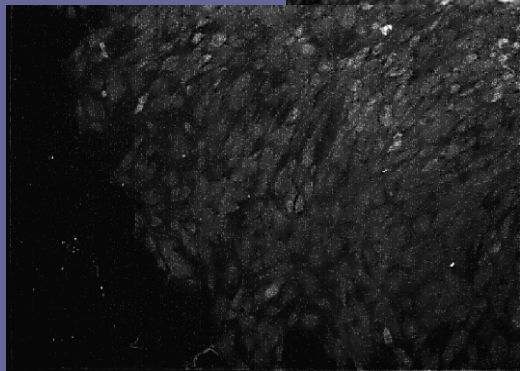
Les souris BSP-/- forment moins d'os médullaire, qui est résorbé plus lentement

L'extinction génique de la BSP affecte-t-elle préférentiellement la formation et/ou le modelage de l'os primaire?

Osteocalcin

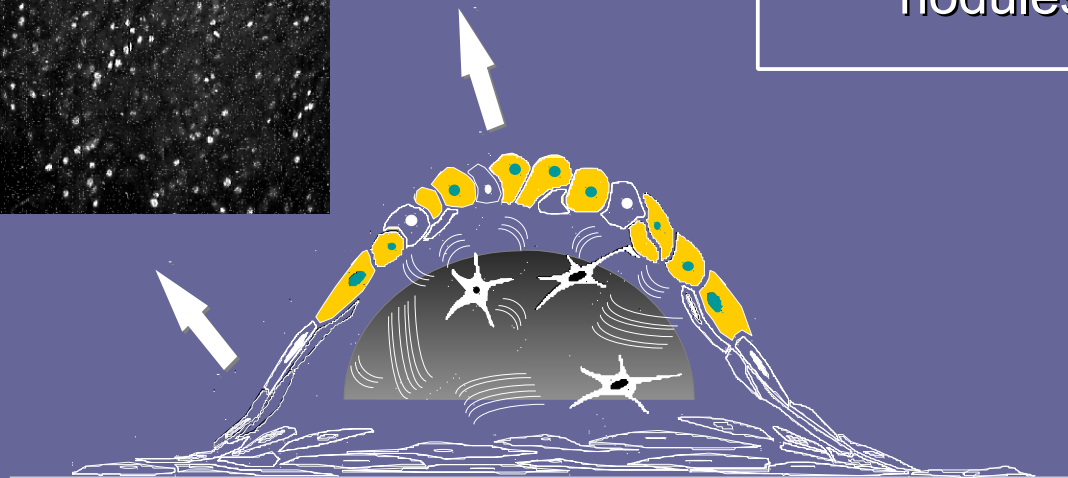


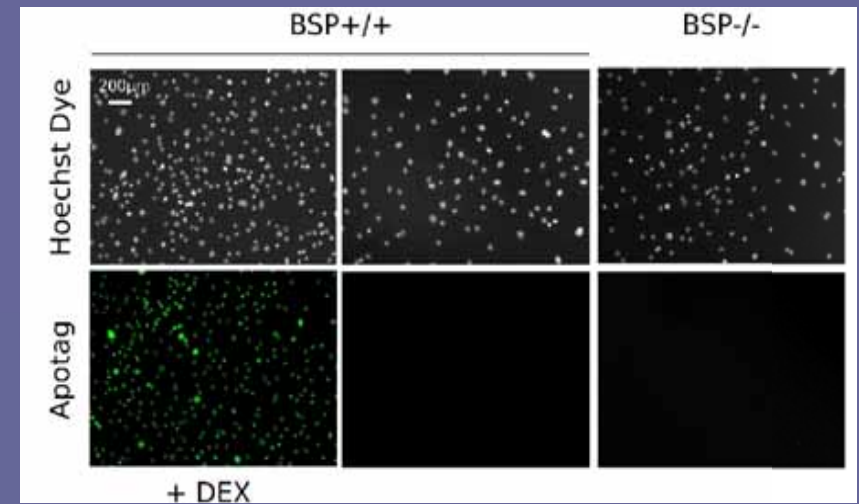
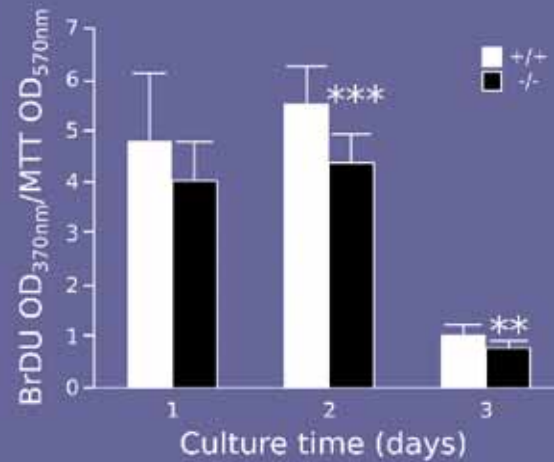
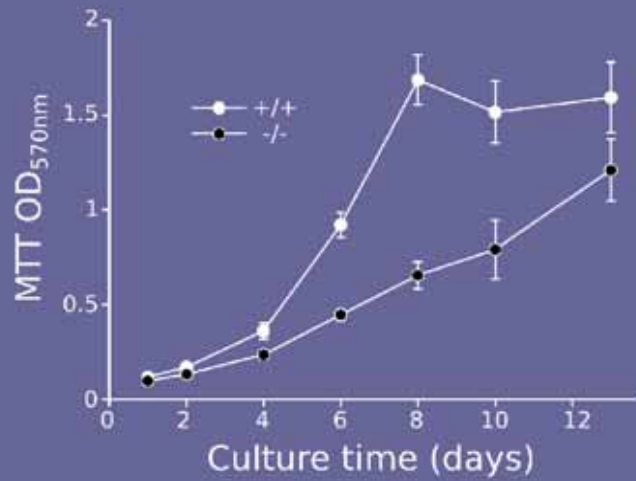
BSP



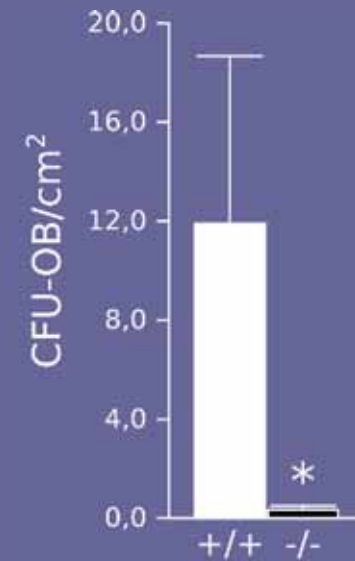
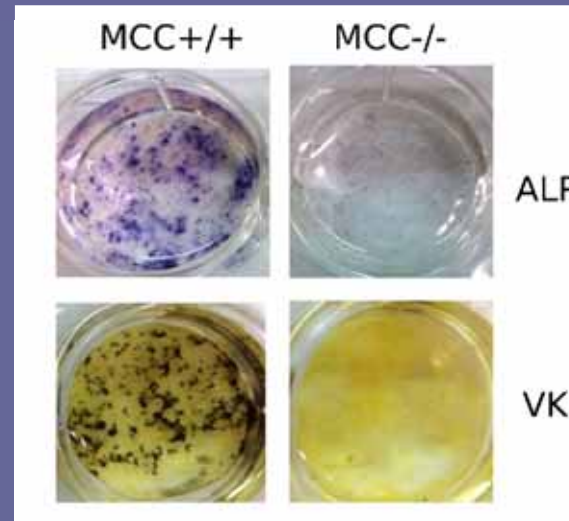
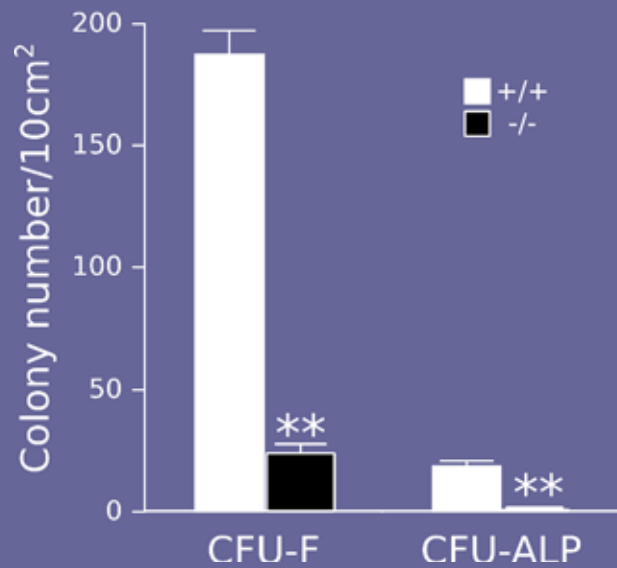
BRdU

Prolifération cellulaire et
différenciation des
ostéoblastes dans les
nodules jeunes

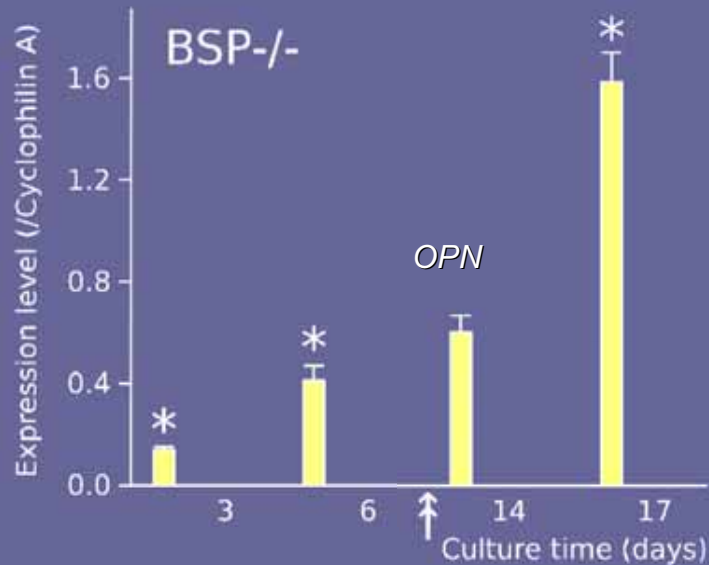
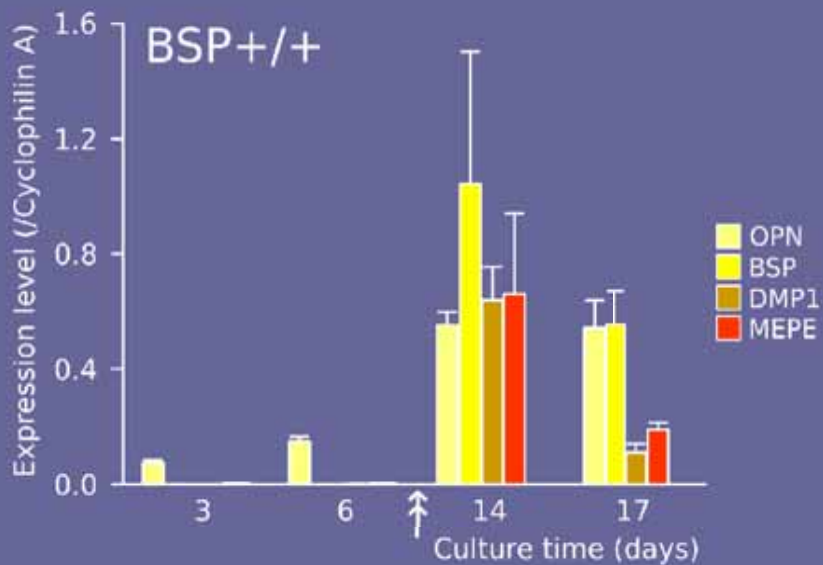
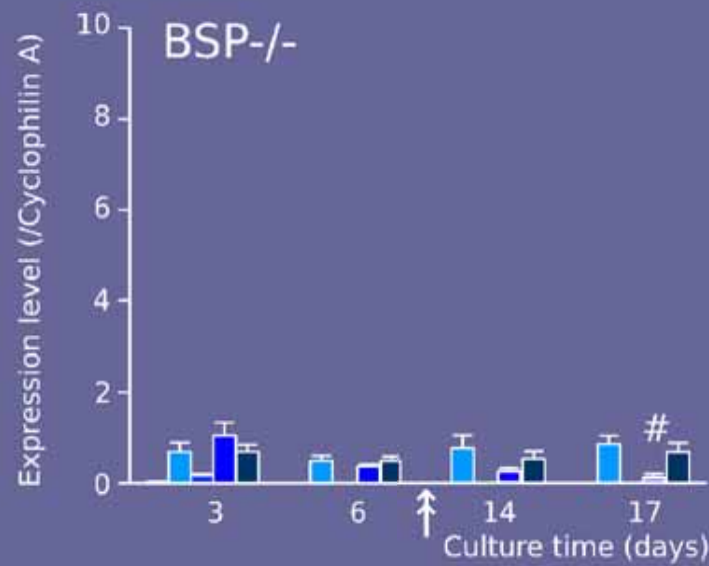
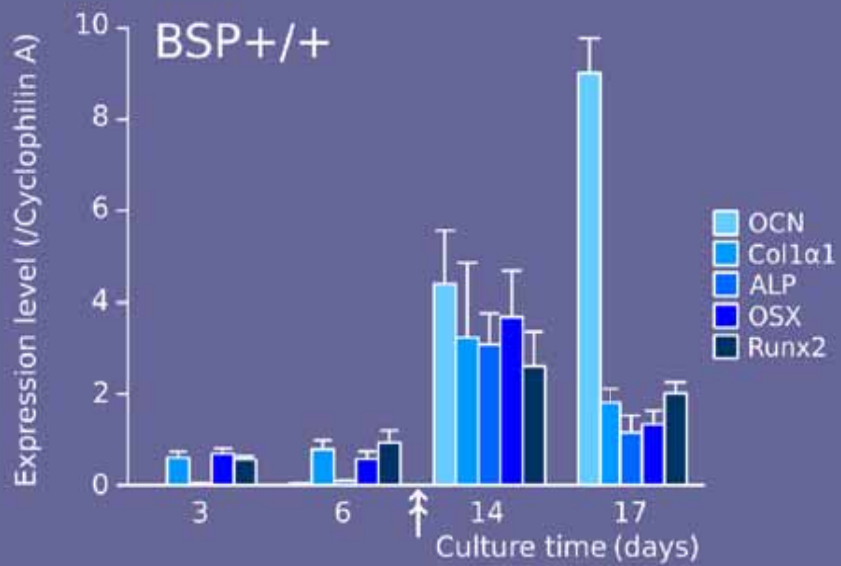




Bouet G et al., 2015, PLoS ONE 10(2): e0117402

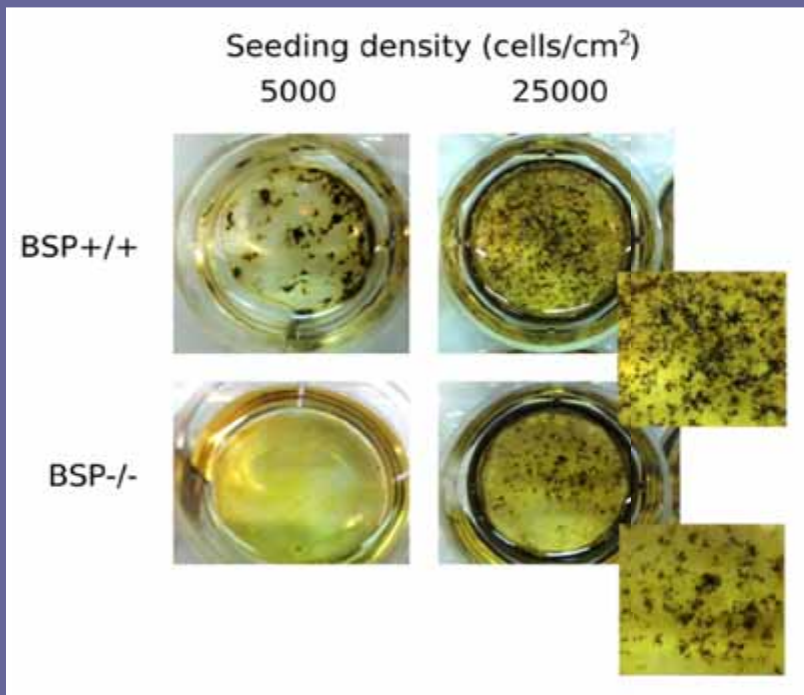


L'absence de BSP inhibe à la fois la prolifération et la différenciation des progéniteurs ostéoblastiques (= formation de nodules)

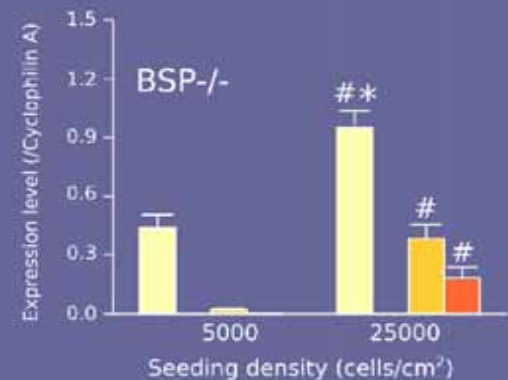
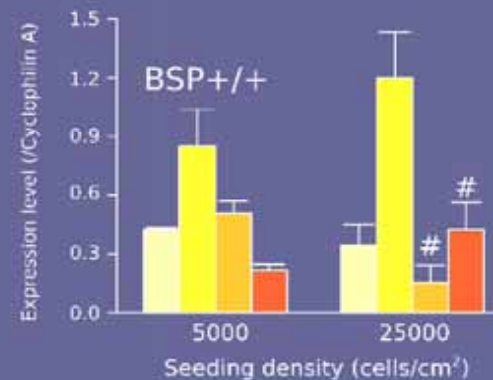
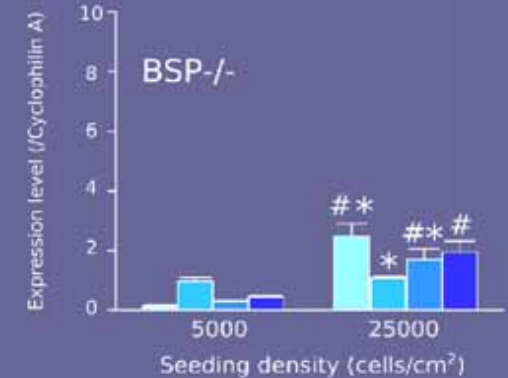
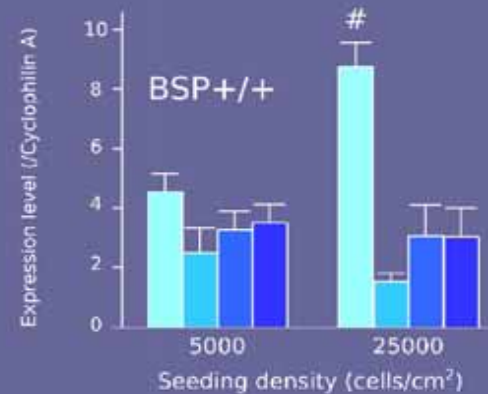
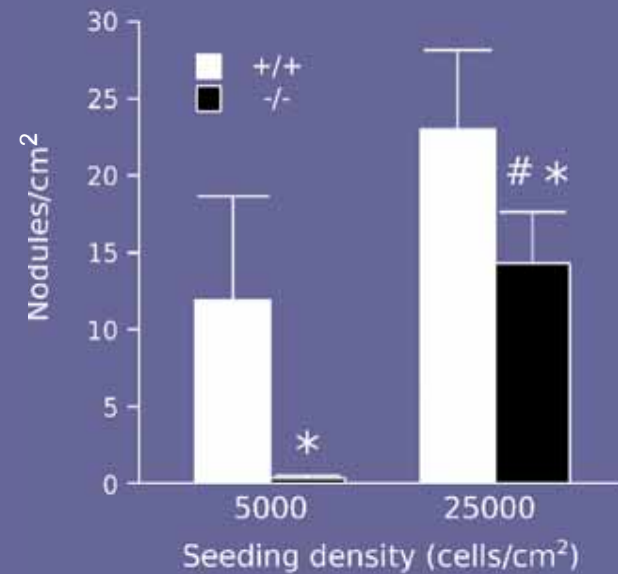


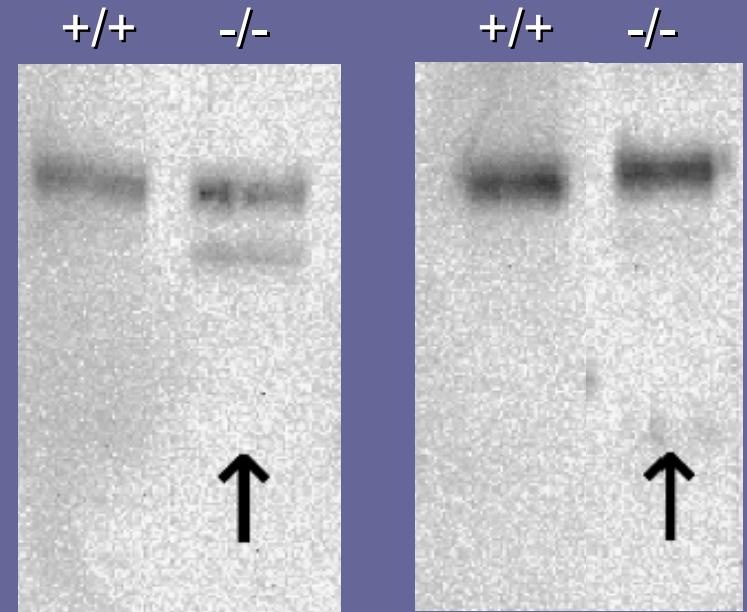
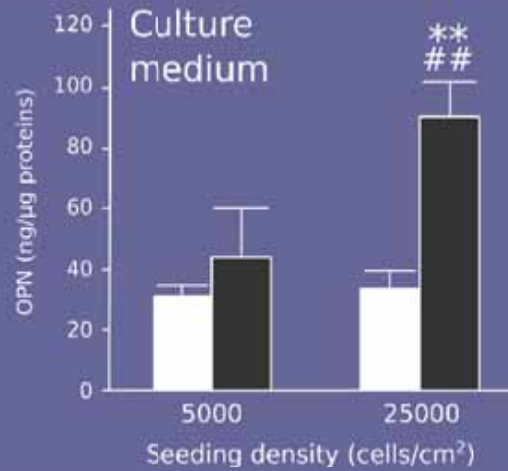
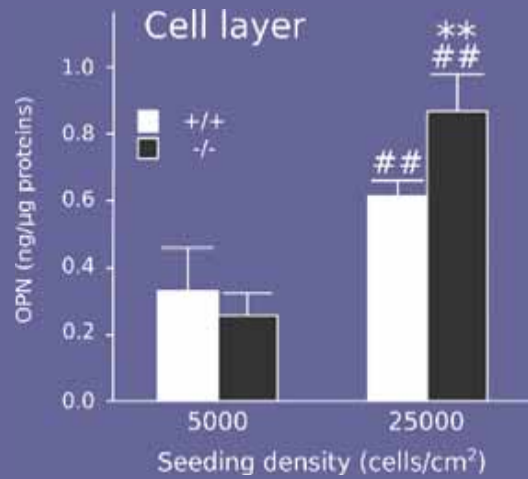
Les cultures BSP-/- expriment peu/pas les marqueurs osseux, à part l'OPN qui est surexprimée...

→ Apparition des nodules



Repiquées à haute densité (25000 cellules/cm²), les cellules BSP-/- expriment davantage les marqueurs osseux, forment des nodules et se mettent à exprimer les SIBLING

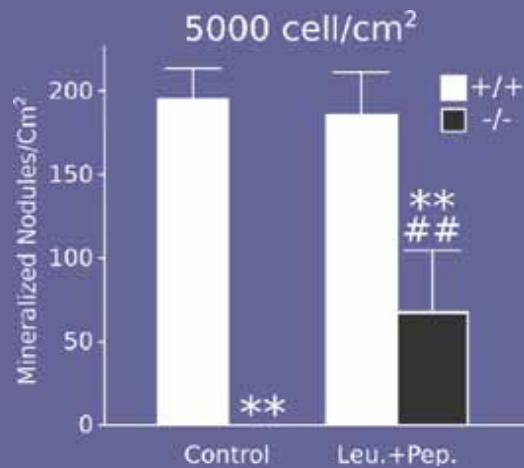




5000/cm²

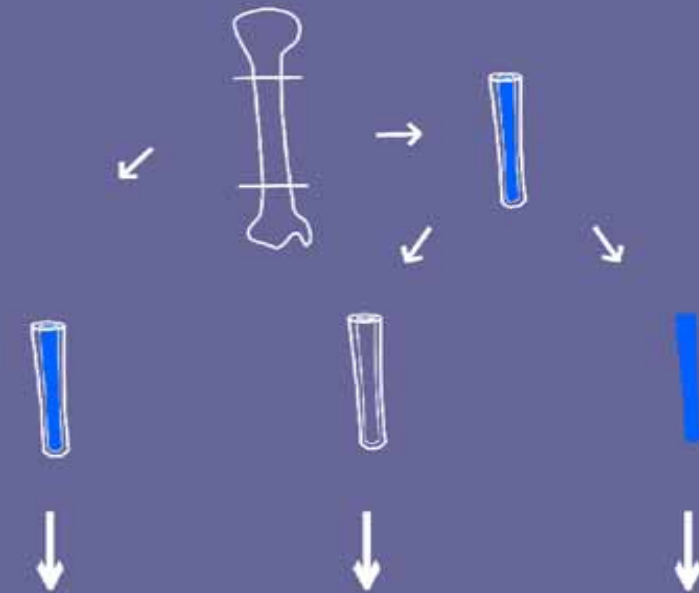
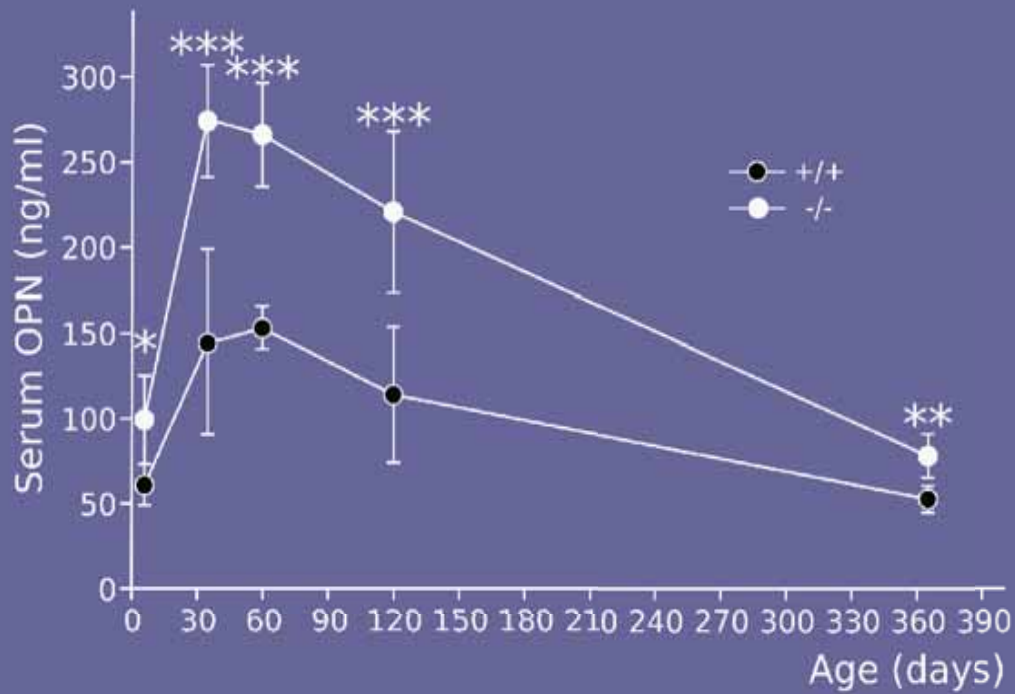
25000/cm²

(Laura Juignet, données non publiées)

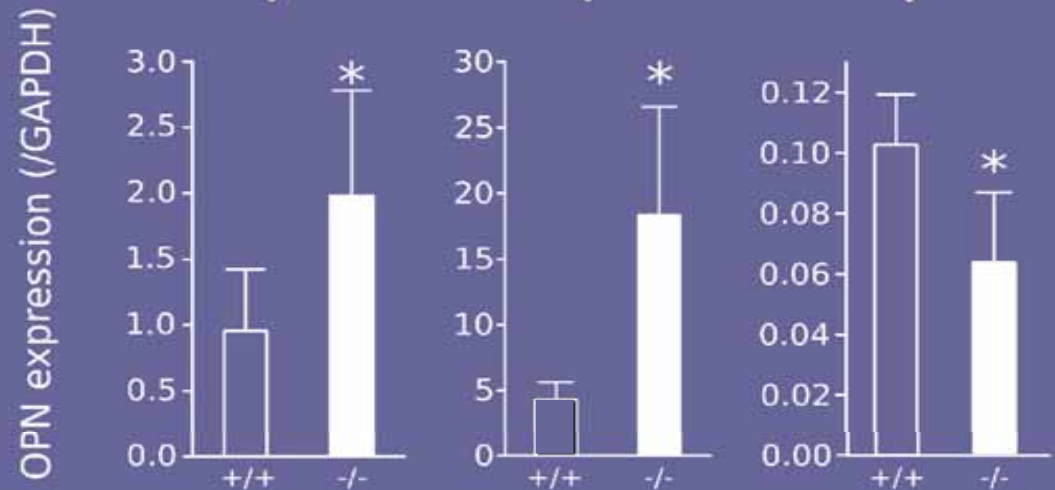


Les fragments d'OPN abondants dans les cultures BSP-/- (ASARM?) contribuent-ils à l'inhibition de l'ostéogenèse ?

- La BSP régule la **clonogénicité** des ostéoblastes de calvaria de souris, leur **différenciation** et leur activité
- Cet effet est dépendant de la densité cellulaire, en accord avec l'ostéogenèse sub-normale des souris BSP-/-
- Le clivage de l'OPN pourrait jouer un rôle dans l'inhibition de l'ostéogenèse et de la minéralisation en l'absence de BSP



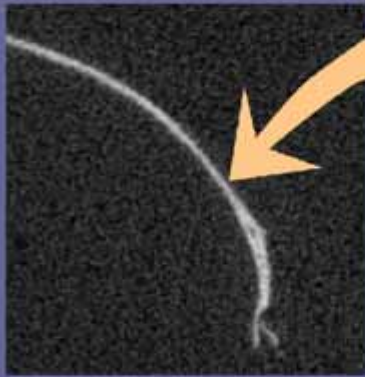
Les taux circulants d'OPN, ainsi que son expression dans le tissu osseux sont beaucoup plus élevées chez les souris BSP-/-



Un effet majeur de l'extinction de la BSP est la surexpression d'OPN.

Dans quelle mesure cet effet est-il compensateur ?

L'OPN est-elle un « vicariant » de la BSP ?

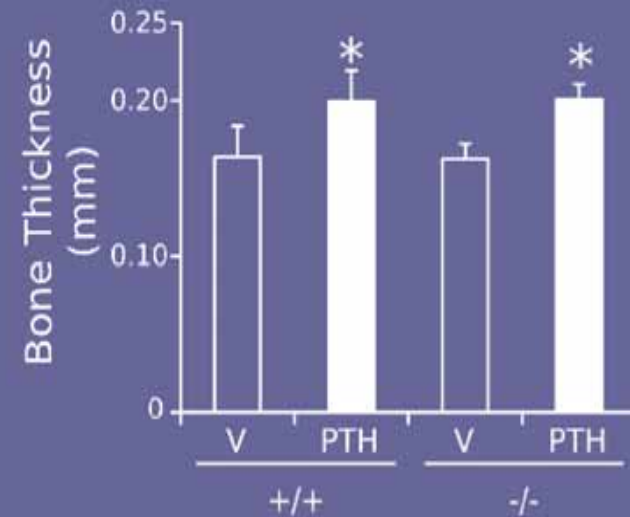
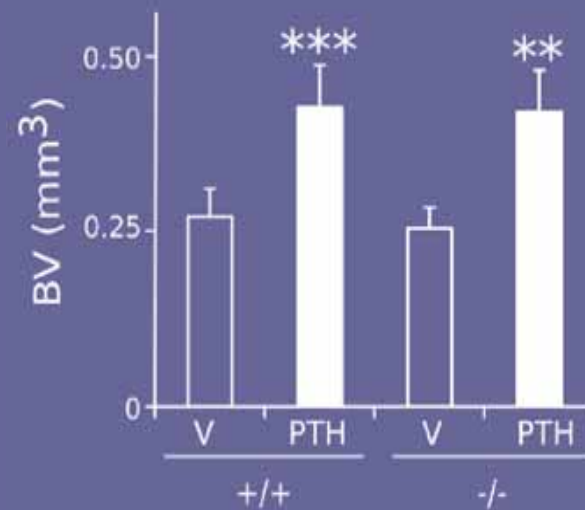


NaCl

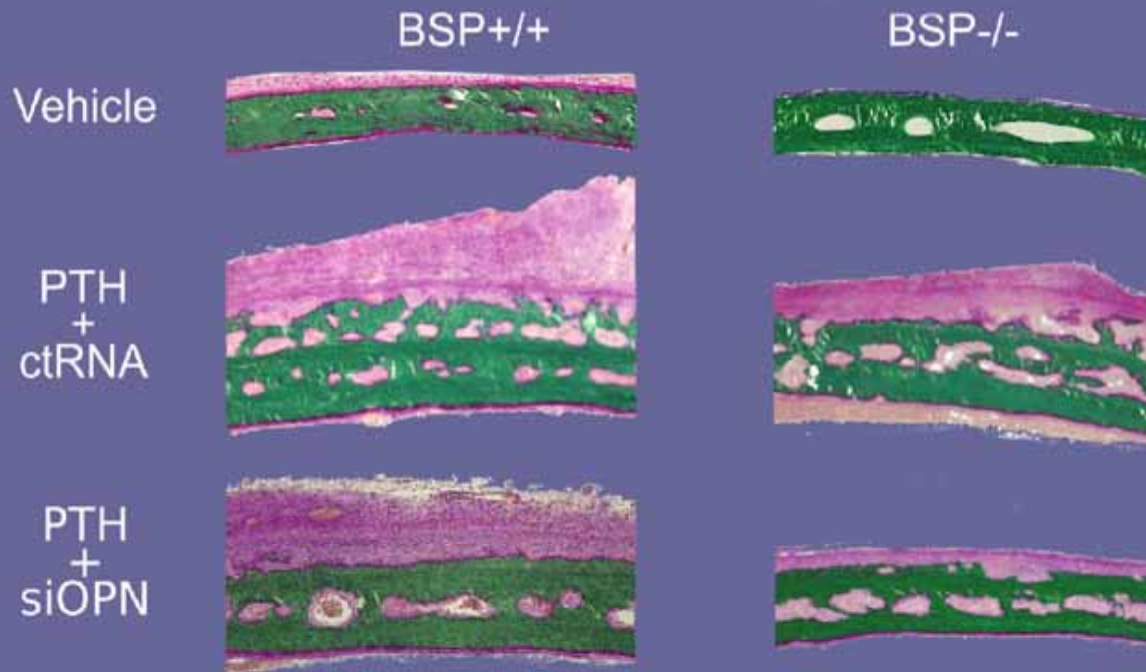


iPTH

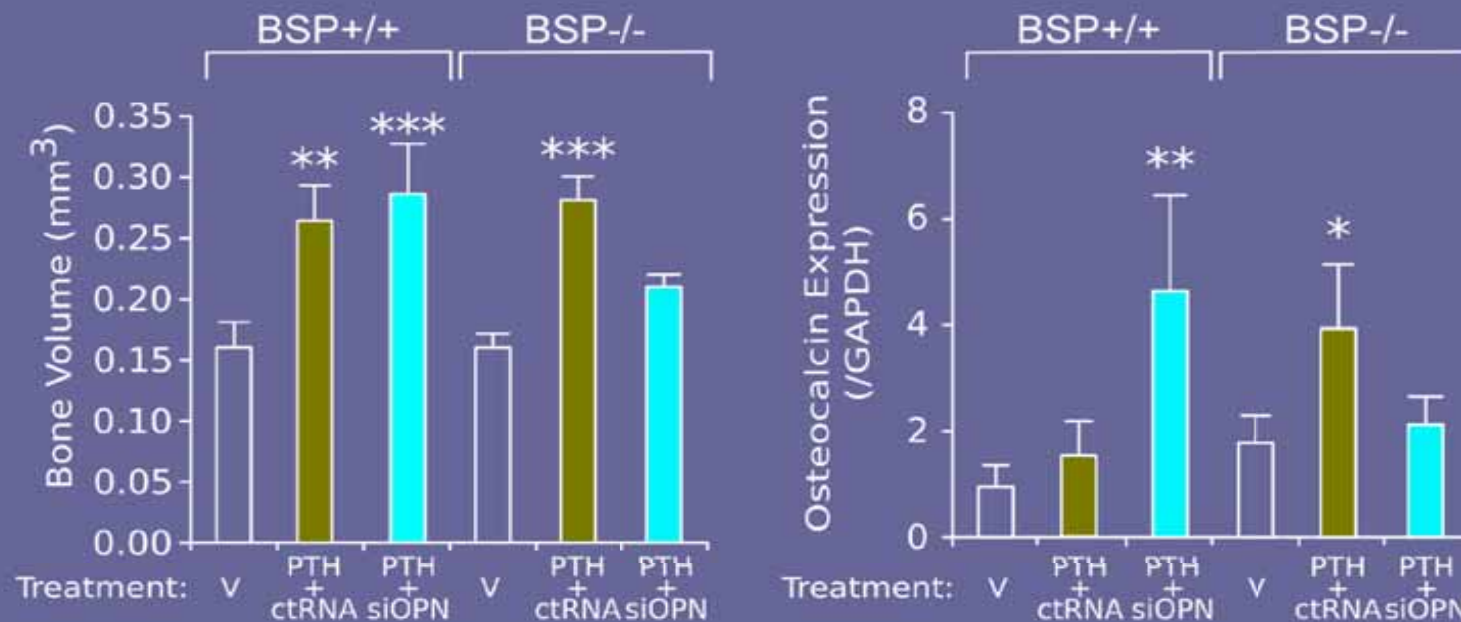
L'injection quotidienne de PTH 1-84 (iPTH) sur la calotte crânienne entraîne une hyperformation osseuse locale, chez les souris BSP+/+ et BSP-/-



Bouleftour et al.,
J Cell Physiol,
230: 568, 2015



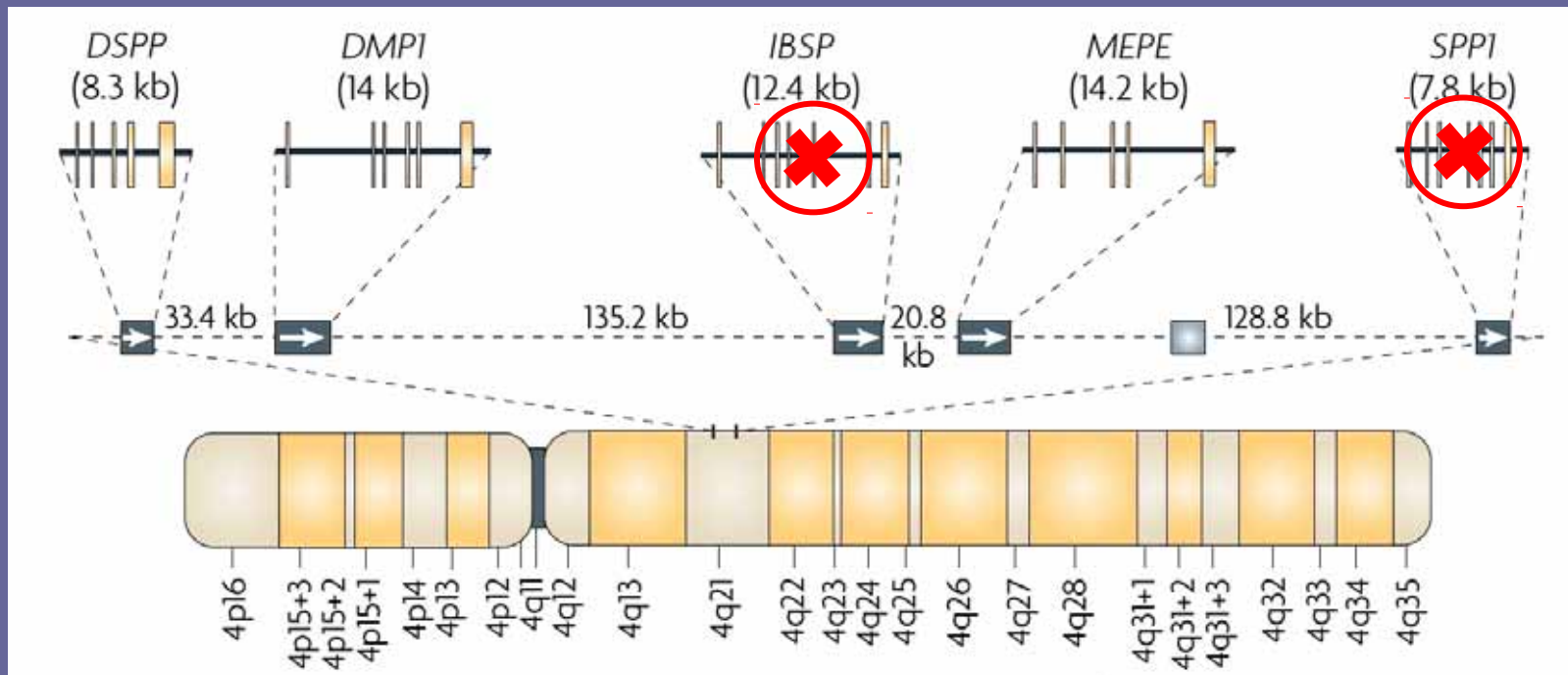
Le blocage par siRNA de l'expression d'OPN ne modifie pas l'action anabolique de l'hormone dans les calvaria BSP+/+, alors qu'il bloque les effets de l'PTH dans les souris BSP-/-



- La pleine expression de l'OPN ou de la BSP est nécessaire à l'effet anabolisant de la PTH au moins dans le modèle d'injection de calvaria ectopique
- L'OPN peut compenser l'absence de BSP dans la réponse à ce défi hormonal
- Il existe un chevauchement fonctionnel entre ces deux protéines apparentées

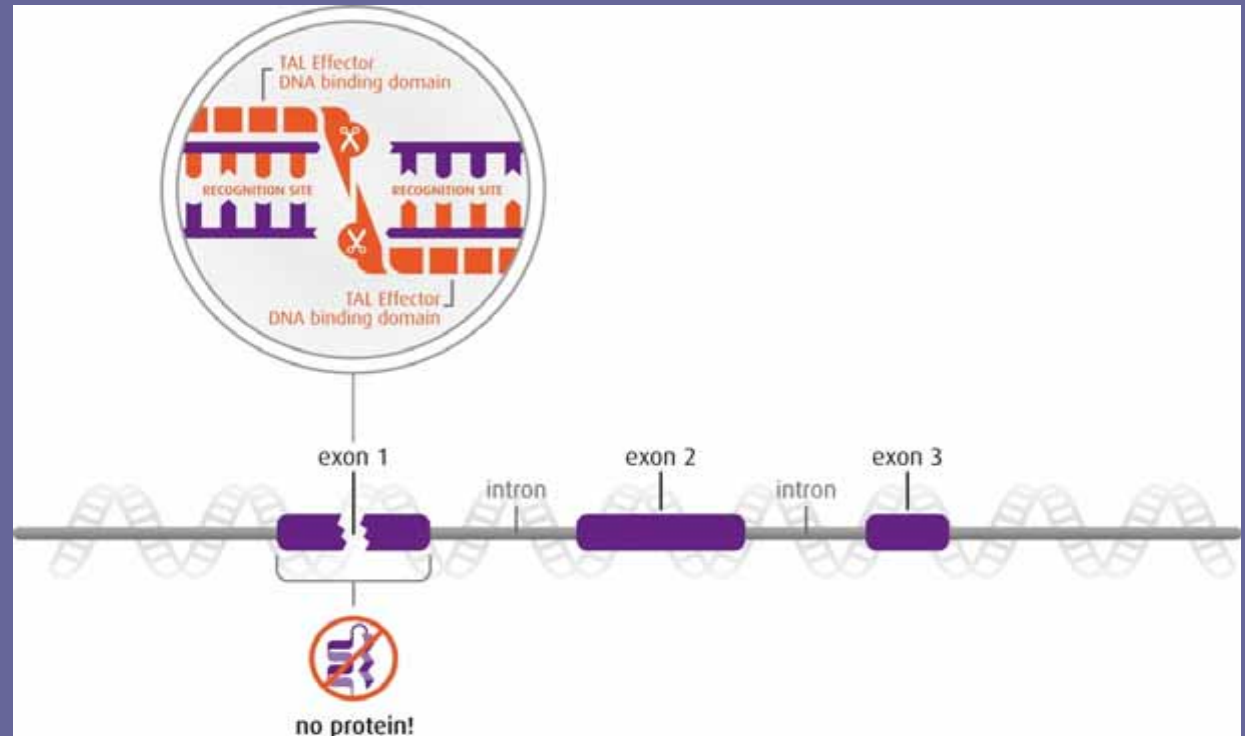
- La BSP joue un rôle régulateur important de l'ostéogenèse, en particulier dans l'os primaire, et de la résorption
- Son absence affecte aussi d'autres fonctions squelettiques comme l'hématopoïèse et l'angiogenèse
- Tandis que certaines fonctions de la BSP peuvent être compensées par l'OPN, leurs rôles apparaissent souvent comme distincts (suspension, ovariectomie...) et la surexpression d'OPN pourrait expliquer une partie des conséquences de l'absence de BSP... (hypominéralisation?)
- Des expériences de double extinction apparaissent nécessaires pour clarifier les rôles respectifs de ces deux SIBLING dans les multiples processus où elles sont impliquées

Outil à développer : Double extinction génique sur le même chromosome



Technique : TALEN

Deux paires de séquences ont été sélectionnées pour réaliser l'extinction du Gène *Spp1* (qui code pour l'OPN).



Targeted sequence TALE mSpp1 (n1)

TGAAATAGCTTTACAGCCtgaccccagatcctatagcCACATGGCTGGTGCCTGA

Sub-unit TALE mSpp1(n1)-L : TGAAATAGCTTTACAGCC

Sub-unit TALE mSpp1(n1)-R : TCAGGCACCAGCCATGTG

Targeted sequence TALE mSpp1 (n2)

TCTCAGAAGCAGAATCTCcttgccgcccacaggtattgTGTTTTAATTTCTCAAAA

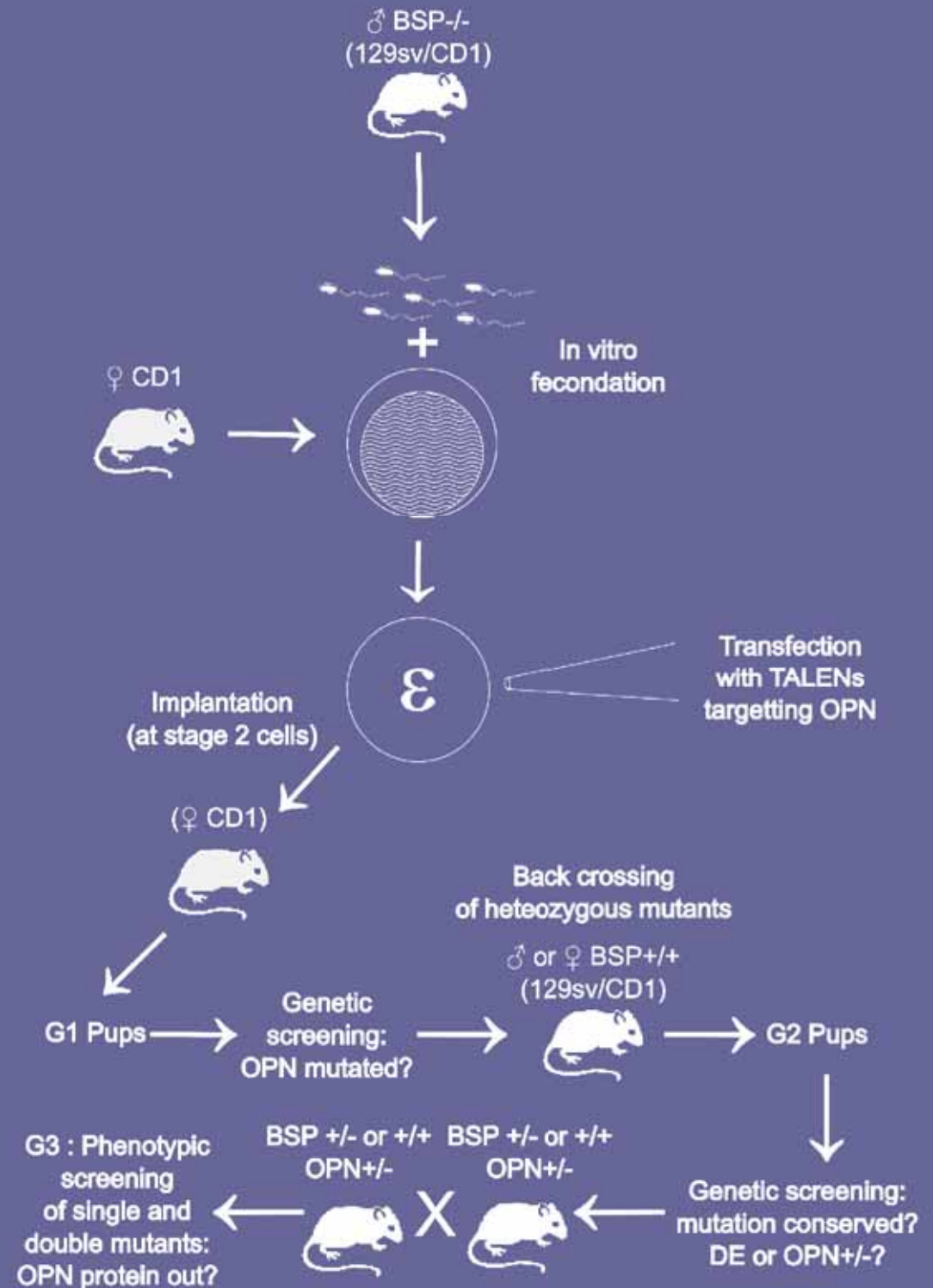
Sub-unit TALE mSpp1(n2)-L : TCTCAGAAGCAGAATCTC

Sub-unit TALE mSpp1(n2)-R : TTTTGAGAAATTAACA

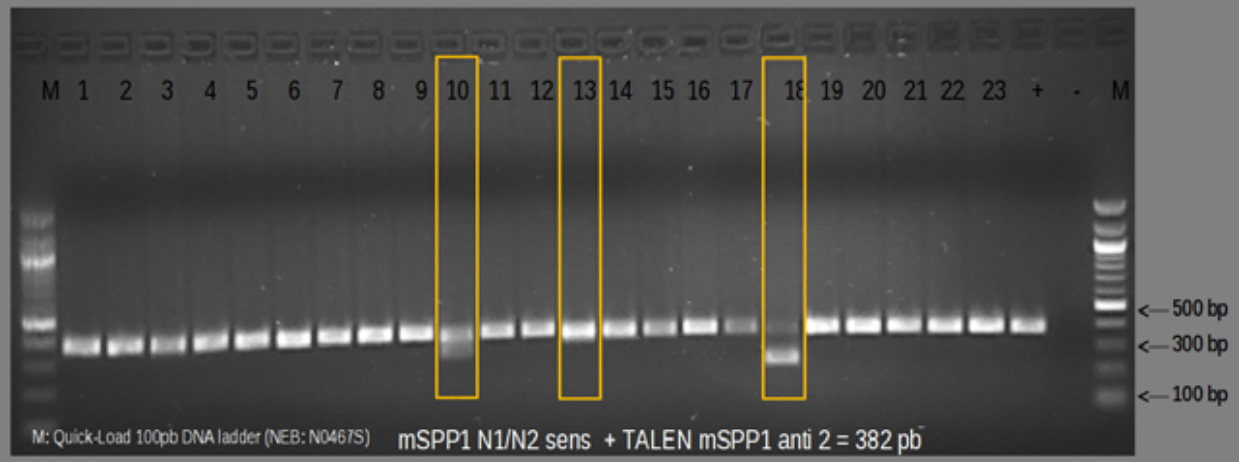


Stratégie :

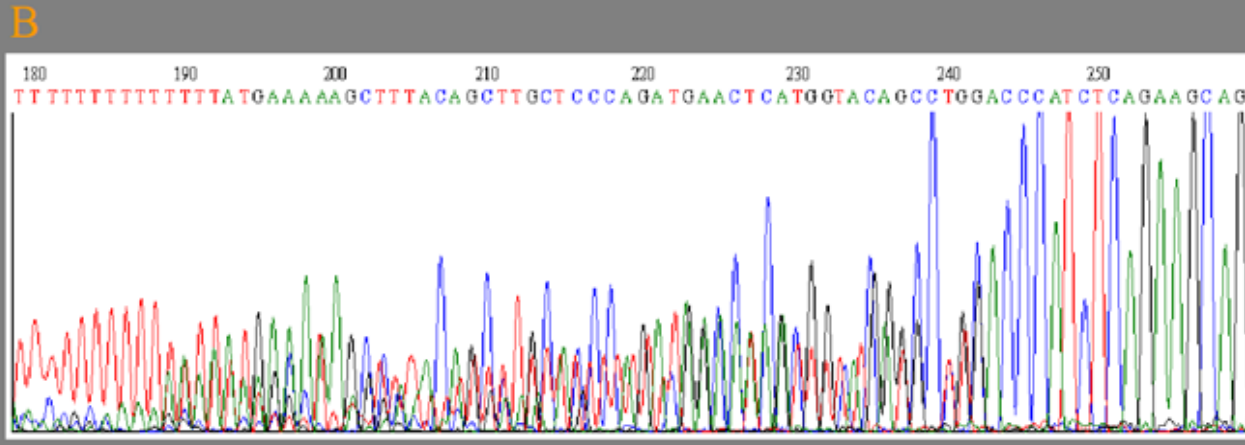
- FIVETE
- microinjection de l'oeuf
- implantation
- criblage des mutations en G1
- croisement avec BSP+/-
- isolement des homozygotes avec simple et double extinction
- criblage ELISA, RT-PCR, Western Blot...
- *criblage des mutations « hors Cible »..*



A 1st generation OPN genotyping (PCR) and sequencing

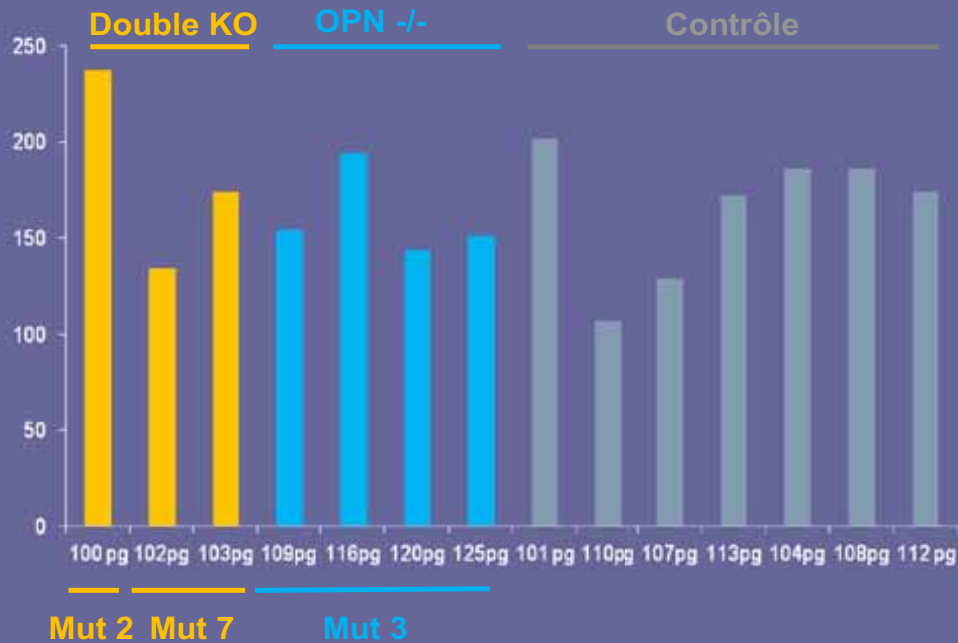


In mice 10, 13 and 18, the *Spp1* mutation is visible, not in others => sequencing required



19 mutations différentes obtenues à partir de 8 fondateurs
→ Les nucléases TALE sont actives tout au long du développement embryonnaire (= Plusieurs souris G1 étaient des mosaïques)

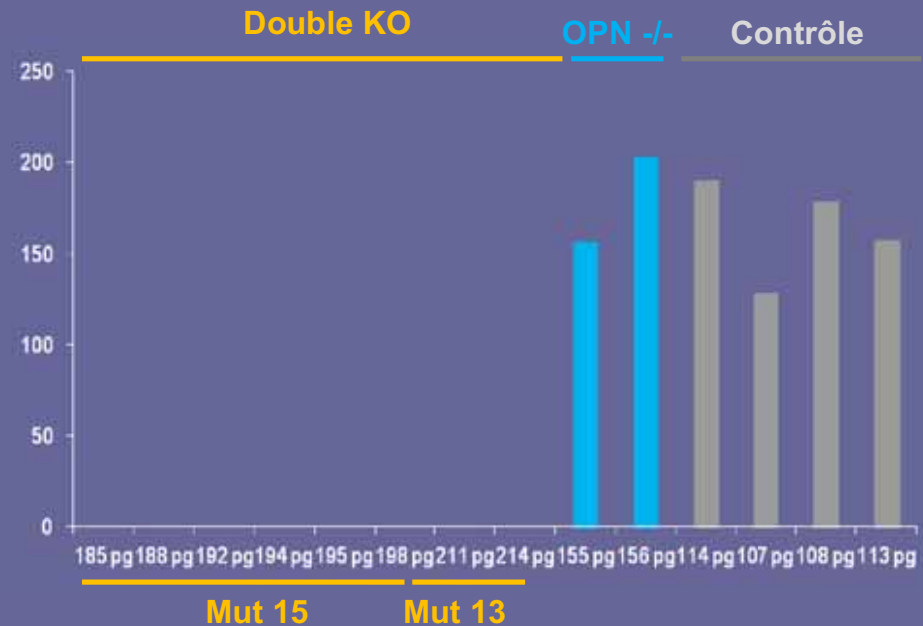
Dosage du taux d'OPN circulante (ELISA)



L'expression de *Spp1* n'est pas éteinte dans les mutations 2, 7 et 3



L'expression de *Spp1* est éteinte dans les mutations 13 et 15



Ibsp^{+/+} Spp1^{-/-}



Extinction OPN sur fond 129sv/CD1

12-déc.-2014

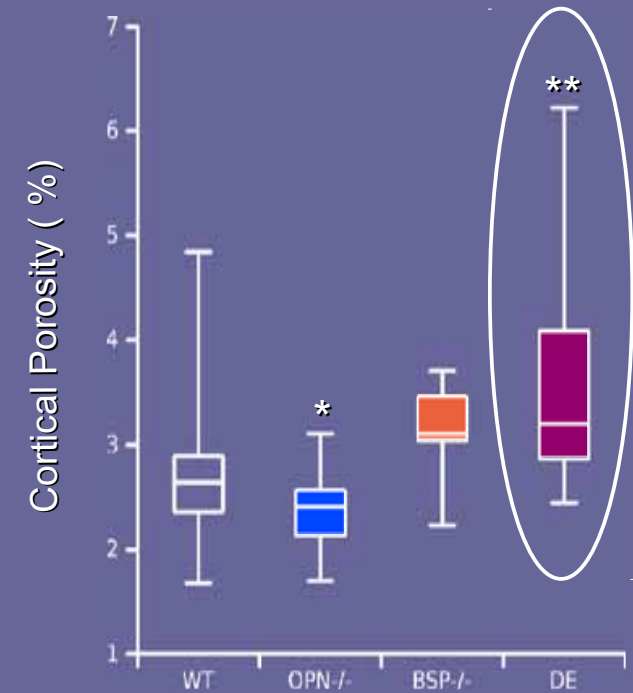
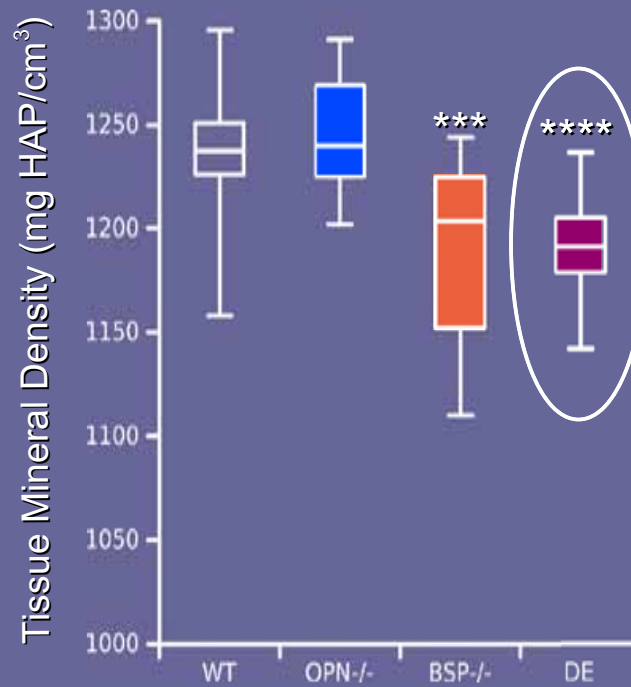
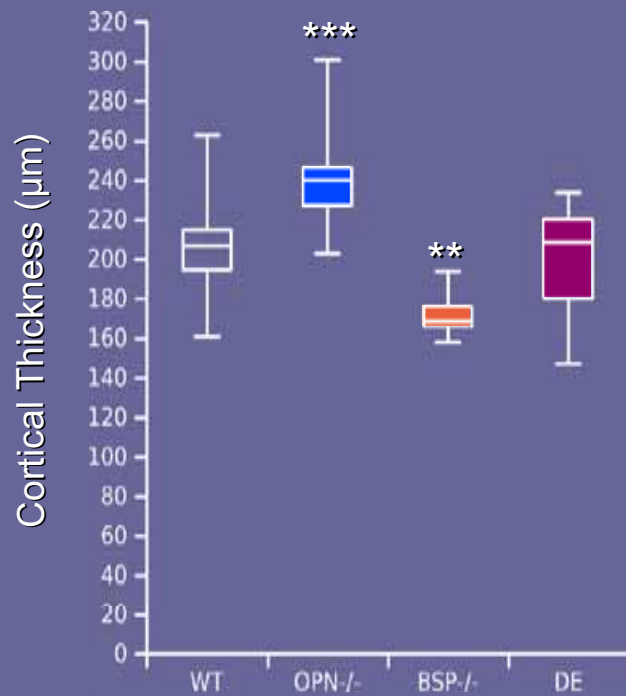
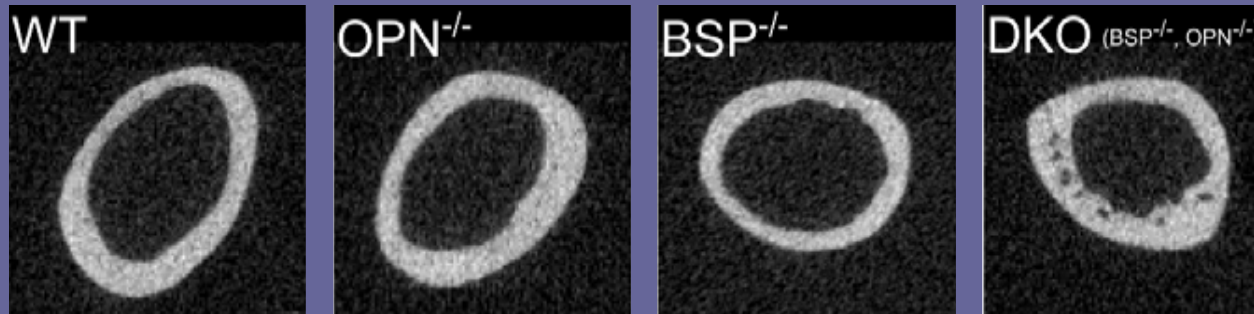
				Extinction gène Spp1 (ostéopontine)			
N° cage/souris porteuse*	Fondateurs	Nomenclature mutation	Fond	Description (référence à la séquence génomique mSPP1 de 5404 pb)	Séquence protéique mSPP1 (de 311 aa) - déduite!	Extinction OPN sérique - ELISA	Extinction OPN os - RT-PCR
1 (2 fondatrices)	F3	mut 1	BSP+/+	délétion CT en 2463-2464	protéine tronquée (61 aa/311 aa)	Oui !	Oui !
4 (4 fondateurs)	F19	mut 10	BSP-/-	délétion CA en 2517-2518	protéine tronquée (78 aa/311 aa)	Oui !	Oui !
	F23	mut 14	BSP+/+	délétion CCAC et mutation en 2515	protéine tronquée (167 aa/311 aa) et mutée à partir de 73aa	Oui !	Non!
2 (3 fondateurs)	M14	mut 15	BSP-/-	délétion de 17 nt en 2453 (et 4T dans poly T16)	protéine tronquée (56 aa/311 aa)	Oui !	Oui !
	M14	mut 16	BSP+/+	délétion CC en 2462	protéine tronquée (61 aa/311 aa)	Oui !	Oui !
: Les cages 1 et 3 n'ont rien donné ou avorté (mort de la fondatrice)			Lignées congelées	Lignées choisies pour expérimentation	/: lignées abandonnées (sans		

Ibsp^{-/-} Spp1^{-/-}

Double extinction OPN + BSP
→ Souris DE



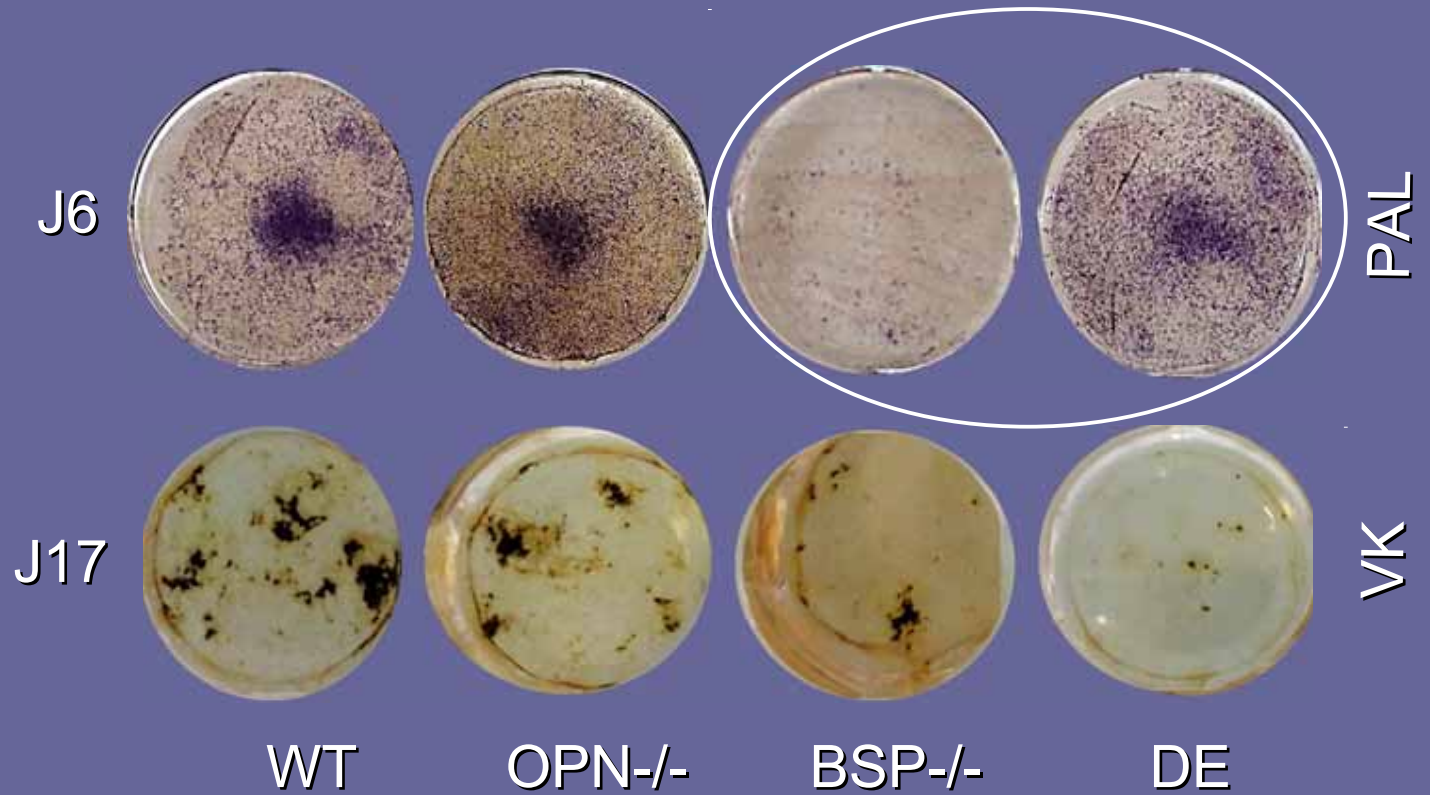
Diaphyse fémorale - microtomographie



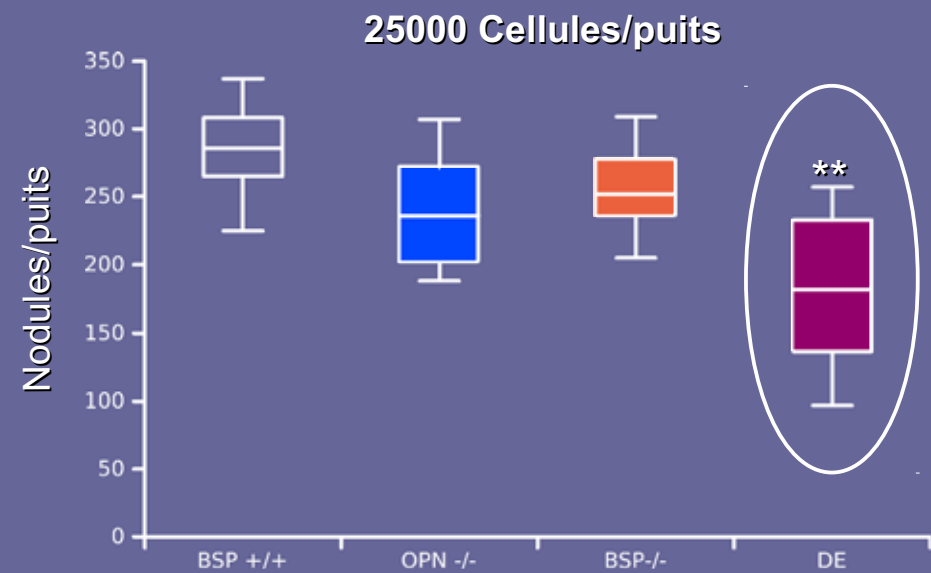
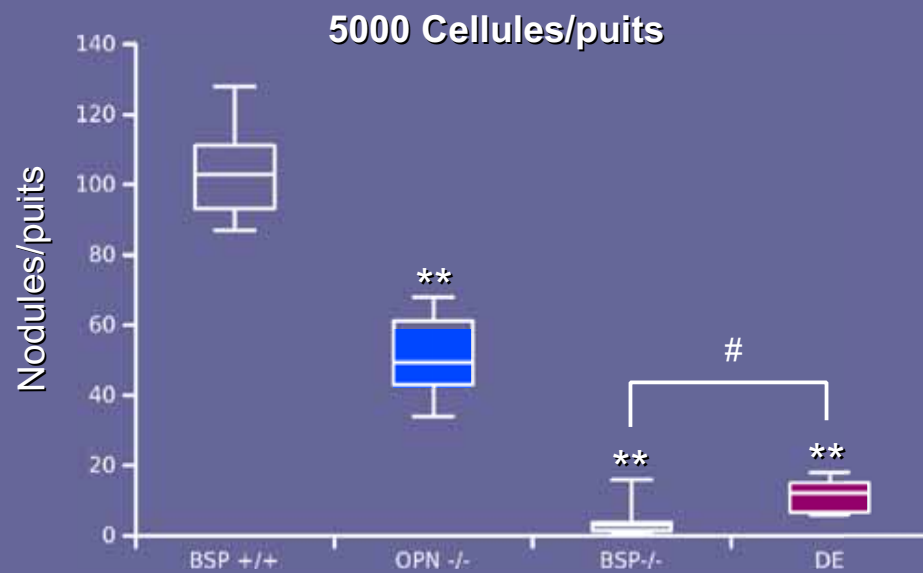
2 month old males, *=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001 vs WT

- L'os cortical des souris DE est hypominéralisé, malgré l'absence d'OPN → le rôle de la BSP dans la minéralisation osseuse serait limitant?
- La haute porosité corticale des DE suggère un remodelage actif, en l'absence de 2 protéines, OPN et BSP décrites comme nécessaire à l'activité des ostéoclastes → compensation par d'autres facteurs, dont une/des SIBLING ?

Cultures de cellules de calvaria



**=p<0.01 vs WT
#=p<0.05



➤ Le grand nombre de colonies PAL+ dans les cultures de calvaria des souris DE indique un recrutement normal des ostéoprogéniteurs → le déficit observé dans les BSP-/- résulterait de la surexpression d'OPN ?

➤ Le défaut d'ostéogenèse en cultures DE n'est pas récupéré par le repiquage en forte densité (contrairement aux BSP-/-) → défaut intrinsèque de différenciation/expression du phénotype ou absence/déficience d'un mécanisme compensateur ?

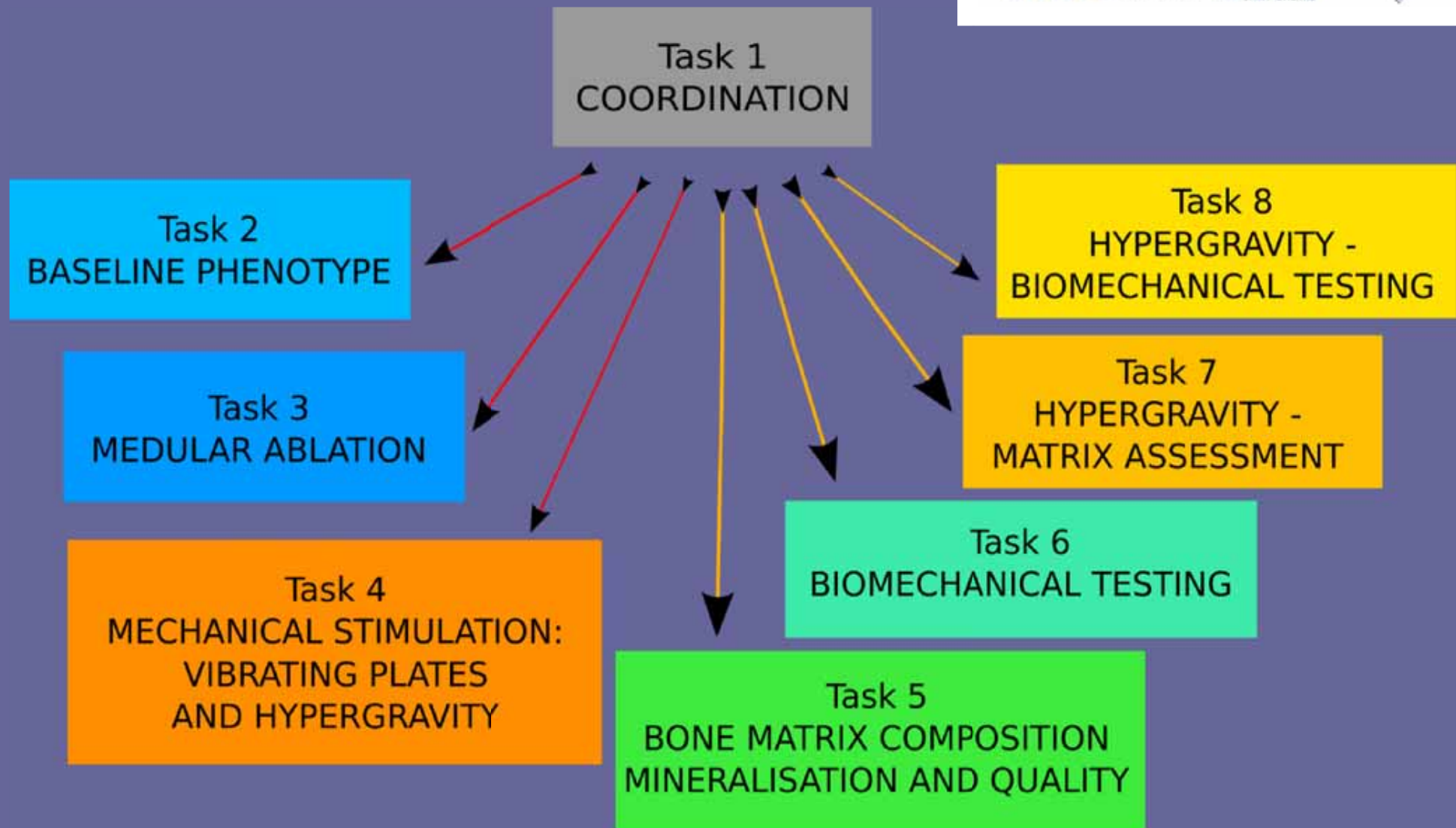
Mouse Kosto



ANR Inserm

Université Jean Monnet
SAINT-ETIENNE

UNIVERSITÉ DE LYON



LBTO – INSERM U1059-SAINBIOSE, Saint Etienne

Dirigé par Laurence Vico

Luc Malaval, Marie Hélène Lafage-Proust

Guénaëlle Bouët → *Développement - Ostéoblastes in vitro*

Wafa Bouleftour → *Développement - PTH/Calvaria - DKO*

Léa Verdière → *DKO - Ablation Médullaire*

Laura Juignet → *DKO - Ostéoblastes in vitro*

**Marie-Thérèse Linossier, Mireille Thomas,
Arnaud Vanden-Bossche, Norbert Laroche**

PLEXAN

Guislain Roux, Priscilla Orlando, Karen Tronchère

Jane E Aubin, Université de Toronto, Canada → *BSP Knockout*

Georges Boivin, Jean-Paul Roux, François Duboeuf, U1033, Lyon → *Minéralisation*

Hélène Follet, Charène Thomas, Delphine Farlay, Evelyne Gineyts, U1033, Lyon → *DKO - Biomécanique, caractérisation matricielle*

Irma Machuca-Gayet, U1033, Lyon → *DKO - Ostéoclastes*

Jean-Paul Concordet, MNHN USM503, Paris; Marie Teixeira, Denise Aubert, Irma Machuca-Gayet, PBES/ENS, Lyon → *TALen, DKO*

Inserm

Institut national
de la santé et de la recherche médicale

FINANCÉ PAR
ANR

