

# CONTRÔLE CENTRAL DE LA FORMATION OSSEUSE

par

G. KARSENTY\*

## **Le remodelage osseux : une fonction complexe**

Chez l'homme et chez les vertébrés en général, la masse osseuse reste constante entre la fin de la période de croissance osseuse linéaire et la défaillance gonadique, grâce à un processus complexe et dynamique appelé remodelage osseux [1]. Initialement, l'os pré-existant est résorbé par un type de cellules spécifiques de l'os, appelé ostéoclastes. Il s'agit d'une étape relativement rapide qui se déroule en quelques semaines. Elle est suivie de la formation osseuse *de novo*, mettant en jeu un autre type de cellules, également spécifiques pour le squelette, appelé ostéoblastes. Cette dernière étape se déroule plus lentement, pouvant durer plusieurs mois, ce qui fait qu'un cycle de remodelage osseux typique dure au moins trois mois. De tels cycles de destruction/formation continus se déroulent simultanément dans plusieurs sites osseux, de sorte que la masse osseuse totale d'un individu donné reste constante jusqu'aux stades tardifs de la vie. Ainsi chez la femme, la masse osseuse reste constante jusqu'à la ménopause. C'est l'insuffisance de la production d'hormones sexuelles qui est à l'origine d'une augmentation relative de la résorption sur la formation osseuse et qui conduit finalement à une diminution de la masse osseuse (ostéopénie) et au risque potentiel de fractures, suite à des traumatismes minimes (ostéoporose) [1]. L'importance biologique du remodelage osseux est bien illustrée par le fait que l'ostéoporose est l'atteinte dégénérative la plus fréquente des pays développés, touchant par exemple 28 millions de personnes aux États-Unis. De plus, son incidence est en constante augmentation avec le vieillissement progressif de la population générale.

Le fait que le remodelage osseux se déroule simultanément dans plusieurs sites osseux, a été longtemps considéré comme un argument assez fort en faveur d'une régulation locale, autocrine et/ou paracrine [2]. Il existe en effet un certain nombre de preuves expérimentales en faveur de ce type de régulation. L'une d'elles, et

\* Baylor College of Medicine, One Baylor Place, Houston TX 77030.

non la moindre, est qu'il a été montré que la différenciation des ostéoclastes, c'est-à-dire les cellules assurant la résorption osseuse, dépendait de la présence de gènes exprimés dans les ostéoblastes, assurant la formation osseuse. À titre d'exemple, des expériences génétiques effectuées chez la souris ont montré que l'ostéoprotégerine (OPG), un récepteur soluble de la famille des récepteurs au TNF $\alpha$  présent dans la matrice osseuse extracellulaire, inhibe la différenciation ostéoclastique, alors que le ligand de l'ostéoprotégerine, un facteur de croissance également présent dans le micro-environnement osseux, favorise la résorption osseuse [3-6]. Dans une certaine mesure une autre cytokine, l'IL-6, est également impliquée dans le contrôle de la résorption osseuse [7], et il est probable qu'on identifiera d'autres molécules sécrétées, pouvant contribuer à ce type de régulation du turnover osseux.

L'observation même que le remodelage osseux se déroule dans plusieurs sites en même temps peut également servir d'argument en faveur d'une régulation endocrine de ce remodelage. Une telle régulation n'est pas vraiment surprenante, dans la mesure où la plupart des fonctions homéostatiques de l'organisme sont soumises à une régulation hormonale qui se superpose à la régulation locale. Ici encore, l'évidence pour ce type de régulation est incontestable. Comme déjà mentionné plus haut, les hormones stéroïdes sexuelles jouent un rôle critique dans le contrôle très étroit de la différenciation ostéoclastique et de la résorption osseuse [8]. Nous ne comprenons pas encore très bien leurs mécanismes d'action, mais il est clair que l'insuffisance des fonctions gonadiques chez la femme, et aussi d'une certaine façon chez l'homme, favorise la résorption osseuse chez l'humain, le rat et, à un moindre degré, chez la souris. D'autres hormones favorisent la résorption physiologique, telle l'hormone parathyroïdienne (PTH), dont le mécanisme d'action dans le squelette reste relativement mal compris [9], et la calcitonine qui possède des récepteurs sur les ostéoclastes [10]. Le contrôle endocrinien de la résorption osseuse par les ostéoclastes déjà différenciés joue un rôle crucial mais cela n'exclut pas le rôle potentiel de facteurs locaux pouvant contribuer à l'action de résorption des hormones circulantes, ou pouvant l'amplifier. Il est important de souligner, dès à présent, que ces deux types de régulation, local et endocrine systémique, ne sont pas mutuellement exclusifs. Au contraire, ils peuvent en fait être synergiques.

### **Le contrôle de la formation osseuse est mal compris**

Tous les processus de régulation décrits ci-dessus, peu importe leur nature, influencent le remodelage osseux du côté de la résorption, ce qui indique un manque de connaissances surprenant en ce qui concerne le contrôle moléculaire de la formation osseuse par les ostéoblastes. À l'heure actuelle, la seule molécule connue pour influencer la vitesse de formation osseuse par les ostéoblastes, est le facteur de transcription Cbfa1 [11]. On serait cependant tenté de postuler l'existence d'un même type de régulation pour la formation osseuse que celui qui contrôle la résorption osseuse, c'est-à-dire des régulations aussi bien d'ordre local que d'ordre hormonal systémique. Une expérience effectuée dans notre laboratoire nous a même fait suggérer de façon plus fondée qu'il existe une régulation endocrine étroite et critique de la formation osseuse. Il est surprenant de constater que la signification la plus importante de cette expérience nous a initialement échappé. L'étude expérimentale était la suivante.

Nous avons créé des souris transgéniques (osk-tk), exprimant la *thymidine kinase* (*tk*) spécifiquement dans des ostéoblastes différenciés, c'est-à-dire les

seules cellules synthétisant de la matrice osseuse [12]. Le produit de ce gène ne devient actif que lorsque les cellules exprimant *tk* sont traitées par du ganciclovir. Cela conduit à l'interruption de la réplication de l'ADN dans les cellules exprimant *tk* et à la mort cellulaire. Le processus d'apoptose est réversible lors de l'arrêt du traitement par le ganciclovir.

En l'absence d'une quelconque formation osseuse détectable, la résorption osseuse se poursuit de façon ininterrompue chez ces souris *osc-tk*. Il en résulte des os vides et les souris *osc-tk* arrêtent leur croissance puisqu'une activité ostéoblastique est requise pour la croissance longitudinale du squelette. De façon surprenante, lors de l'arrêt du traitement par le ganciclovir, et cela en un mois, ce qui est une période de temps très courte, compte tenu des délais habituels du remodelage osseux, les os des souris transgéniques étaient capables de retrouver un aspect normal, et les souris *osc-tk* elles-mêmes une taille normale. Ce qui était la chose la plus remarquable dans ce rattrapage de croissance est son extrême précision. Les souris *osc-tk* transgéniques ont en effet retrouvé un volume osseux normal, ni plus ni moins que leurs congénères « sauvages ». Cette précision extrême du processus de rattrapage, de même que sa vitesse, nous ont suggéré que les ostéoblastes différenciés étaient en quelque sorte capables de savoir combien de matrice osseuse devait être synthétisée dans différentes circonstances, et qu'elles disposaient d'au moins deux vitesses pour cette synthèse. Ainsi les ostéoblastes pouvaient produire de larges quantités de matrice osseuse pendant plusieurs jours après l'arrêt du ganciclovir, dans le but de réhabiter le squelette. Ensuite, lorsque le volume osseux des souris normales témoins était atteint, les ostéoblastes des souris *osc-tk* paraissaient capables de diminuer la production de matrice osseuse, permettant ainsi de maintenir un volume osseux normal. Nous avons interprété cette capacité des ostéoblastes de détecter les besoins en synthèse protéique comme indiquant l'existence d'un contrôle endocrinien de la formation osseuse. Cela nous a fait rechercher des hormones potentiellement impliquées dans la régulation de la fonction ostéoblastique dans des conditions physiologiques.

### **Arguments en faveur d'un contrôle simultané de la masse osseuse, du poids corporel et de la reproduction**

Pour identifier des molécules circulantes pouvant réguler la formation osseuse, nous avons décidé de nous baser sur les données de la littérature clinique pour identifier une voie endocrine unique. Comme mentionné plus haut, la perturbation la plus fréquente du remodelage osseux est l'ostéoporose, caractérisée par une augmentation relative de la résorption osseuse sur la formation osseuse. Parmi la multitude des signes cliniques caractérisant l'ostéoporose, nous étions frappés par deux d'entre eux : l'insuffisance gonadique qui favorise la perte osseuse, et l'obésité qui protège contre celle-ci, même après la ménopause [13-17]. Nous avons alors émis l'hypothèse que le fait que la masse osseuse soit sous la dépendance de la fonction gonadique et que le poids corporel contrôle la masse osseuse par ailleurs, pouvait indiquer que ces trois fonctions homéostatiques, c'est-à-dire la masse osseuse, le poids corporel et la reproduction étaient sous le contrôle d'une ou de plusieurs hormones identiques. À la suite des récentes avancées dans la compréhension des processus moléculaires impliqués dans le contrôle de l'appétit et du poids corporel, cette hypothèse pourrait être examinée *in vivo*. Il faut cependant souligner que cette hypothèse repose sur un postulat a priori qu'il faut accepter si

on prend la décision de la tester. Cette hypothèse veut que le contrôle aussi bien du poids corporel que de la reproduction est essentiellement, bien que non exclusivement, de nature neuroendocrine, c'est-à-dire qu'il dépend d'hormones agissant à travers l'hypothalamus ou sécrétées par lui. Par conséquent il était tout à fait possible, dès le début, que cette investigation conduise à la découverte d'une régulation neuro-(endo-)crine du remodelage osseux, et plus spécifiquement de la formation osseuse.

### **Leptine : un régulateur de la formation osseuse**

Dans l'hypothèse d'une régulation commune de la masse osseuse, du poids corporel et de la reproduction, la leptine était certainement un candidat attractif, bien que seulement un parmi d'autres [18, 19]. Ainsi chez la souris, le rat et l'homme déficients en leptine ou son récepteur, deux des fonctions supposées être co-réglées dans ce modèle sont affectées : ces animaux ou ces malades sont obèses et hypogonadiques [20-26]. Avant d'aller plus loin dans la description de l'action osseuse de la leptine, il est important de souligner qu'aucun modèle animal n'a jamais été décrit dans lequel co-existait un hypogonadisme avec une masse osseuse élevée.

Nous nous attendions à ce que l'existence d'un hypogonadisme dans ces deux souches de souris mutantes soit associée à un phénotype de masse osseuse basse, dont la sévérité pouvait être limitée ou non par l'obésité. Ainsi la découverte d'un phénotype de masse osseuse élevée chez ces souris était une surprise totale [27]. Les modifications phénotypiques étaient tellement importantes qu'on pouvait les détecter par une méthode de faible sensibilité, comme une radiographie. Par la suite, elles ont été bien entendu confirmées par une analyse histologique. Ces anomalies phénotypiques concernaient le squelette entier, y compris les os longs, les vertèbres et le crâne, ce qui était parfaitement compatible avec un effet endocrinien. Les souris des groupes initialement analysés étaient âgées de six mois. Elles avaient déjà atteint un stade d'obésité majeure, ce qui posait la question de savoir si cette anomalie phénotypique n'était que secondaire à l'obésité. Pour résoudre ce problème, nous avons utilisé des souris ob/ob, soumises à un régime pauvre en graisses dès la naissance. On peut ainsi retarder l'apparition de l'obésité chez ces souris jusqu'à la sixième semaine de vie. À l'âge de quatre semaines ces souris ob/ob particulières avaient un poids corporel normal, mais elles avaient déjà un phénotype de masse osseuse élevée, bien que moins prononcé que celui observé chez les animaux ob/ob adultes. Ce phénotype paraissait être spécifique de la voie de signalisation de la leptine, puisqu'il n'était pas observé chez les souris jaunes Agouti, c'est-à-dire une autre souche de souris mutante qui développe un phénotype d'obésité secondaire à la liaison de la protéine Agouti au récepteur 4 de la mélanocortine (MC-R4) dans l'hypothalamus [28]. La protéine Agouti agit comme un antagoniste de la transduction du signal MC-R4 [29]. Une augmentation de la masse osseuse n'était observée ni dans ce modèle de souris jaunes Agouti, ni chez des souris sauvages soumises à un régime riche en graisses et en glucides pendant un mois pour induire un état d'obésité.

Il y a trois mécanismes possibles pour obtenir un phénotype de masse osseuse élevée. Le premier est de stimuler la formation de la masse osseuse elle-même, secondairement à une accélération de la différenciation et/ou de la fonction ostéoblastiques. Le second mécanisme opère à travers une insuffisance partielle de la

résorption osseuse. Le troisième mécanisme possible consiste en une combinaison de ces deux mécanismes. Pour étudier la formation osseuse de façon dynamique, on peut se servir de l'histomorphométrie, une technique utilisant la fixation de la tétracycline au front de minéralisation. Ainsi, lorsque ce composé est injecté à huit jours d'intervalle, il permet de mesurer le débit d'apposition minérale, la vitesse de formation osseuse et d'autres paramètres de la formation osseuse [30]. À l'aide de cette technique, nous avons pu démontrer qu'il existait une augmentation nette de tous les paramètres de formation osseuse chez les souris ob/ob et db/db, bien avant la survenue de l'obésité, ce qui n'était le cas chez aucune des souris témoins. Tous les paramètres de la formation osseuse étaient augmentés, à l'exception cependant d'un paramètre important : le nombre d'ostéoblastes était normal chez les souris ob/ob et db/db, indiquant que la leptine n'affectait pas la prolifération ostéoblastique, mais seulement leur fonction. Cette observation est d'importance, puisque l'absence d'un effet mitogénique est certainement un grand avantage si on pense à la possibilité d'utiliser un antagoniste de la voie d'action de la leptine pour favoriser la formation osseuse.

Afin d'étudier le côté de la résorption osseuse chez les souris déficientes en leptine ou sa voie de transduction, nous avons utilisé le fait qu'elles étaient hypogonadiques. L'hypogonadisme s'accompagne toujours d'une augmentation du nombre des ostéoclastes [9]. Cette règle générale vaut également pour les souris ob/ob et db/db. Ainsi nous avons raisonné que si les ostéoclastes de ces souris ne fonctionnaient pas normalement, la correction de leur hypogonadisme devait diminuer le nombre des ostéoclastes sans aggraver pour autant leur phénotype. Si d'un autre côté les ostéoclastes des souris ob/ob et db/db fonctionnaient normalement, la correction de leur hypogonadisme devait aggraver le phénotype osseux, en diminuant le nombre des ostéoclastes. Pour résoudre la question de savoir lequel des deux modèles était correct, nous avons traité des souris ob/ob mâles et femelles avec des implants de testostérone ou d'estradiol pendant quatre mois. Ce traitement était capable de corriger leur hypogonadisme et de diminuer le nombre d'ostéoclastes, mais il conduisait à une aggravation considérable de leur phénotype de masse osseuse élevée, démontrant ainsi, et aussi sur la base d'autres expériences sur des cultures cellulaires *in vitro*, que la leptine n'agissait pas sur la résorption osseuse. À ce stade, le phénotype de masse osseuse élevée était impressionnant, peu importe le mécanisme d'action de la leptine, puisque ce phénomène s'observait chez des souris hypogonadiques. L'observation unique de la coexistence d'une masse osseuse élevée et d'un hypogonadisme nous a stimulés à identifier le mécanisme général de l'action de la leptine dans le contrôle de la formation osseuse.

### **Phénotype dominant d'une masse osseuse élevée en l'absence de transduction du signal de la leptine**

Bien que le phénotype d'une masse osseuse élevée précède la survenue de l'obésité, il reste concevable qu'il soit secondaire à l'existence d'autres anomalies endocriniennes chez les souris ob/ob et db/db. Cette possibilité est au moins théoriquement peu probable, puisqu'on ne connaît aucune hormone capable de stimuler la formation osseuse à un niveau tel qu'il est observé chez les souris ob/ob hypogonadiques ; néanmoins, nous avons testé cette hypothèse de façon appropriée. La plupart des anomalies endocriniennes connues, caractérisant les souris ob/ob et db/db, ne pouvaient exercer que des effets modestes sur la formation ou la résorption

osseuse, à l'exception d'une seule. Ces souris ont un hypercorticisme, c'est-à-dire une condition favorisant la diminution, et non pas l'augmentation, de la formation osseuse [31, 32].

Il y a cependant un argument plus convaincant et plus important encore, permettant d'exclure des dysrégulations endocrines à l'origine de ce phénotype. Il s'agit du fait que le phénotype de masse osseuse élevée peut s'observer chez des animaux *ob/+* et *db/+* qui non seulement ne sont pas obèses, mais ne présentent de plus aucune des anomalies endocriniennes connues, observées chez les souris *ob/ob* et *db/db*. Ce dernier aspect du phénotype osseux, observé en l'absence de leptine, représente certainement un potentiel thérapeutique considérable puisqu'il ouvre la possibilité d'une modulation de la voie de la leptine pour modifier la masse osseuse, sans pour autant modifier le poids corporel. Cet effet dominant indique également que l'os est un organe cible majeur de la leptine, puisqu'il y a peu d'exemples d'hormones pour lesquelles un état de déficience partielle est associé à un phénotype aussi impressionnant.

### **Absence d'argument en faveur d'un effet de leptine local ou endocrinien sur l'ostéoblaste *in vivo***

Si le phénotype de masse osseuse élevée, observé en l'absence de leptine ou de sa voie de transduction transmembranaire, n'est la conséquence d'aucun type d'effet secondaire, comment peut-il alors se développer ? Comme avec toute autre molécule sécrétée, la leptine pourrait transmettre son signal à l'ostéoblaste à travers trois voies possibles, qui en fait ne sont pas mutuellement exclusives. Elle pourrait agir localement à travers des mécanismes autocrines/paracrines ; elle pourrait agir à travers une voie endocrine classique ; enfin elle pourrait agir, comme cela est le cas pour le contrôle d'appétit, à travers une voie neuro-(endo-)crine. Il nous incombe donc, non pas d'essayer de favoriser un mode d'action particulier et d'exclure les deux autres a priori, mais d'analyser de façon aussi neutre que possible les anomalies des souris *ob/ob* et *db/db*, ainsi que de profiter pleinement des enseignements de la génétique murine, tout particulièrement parce qu'elle ouvre de nouvelles voies de recherche et établit de nouveaux concepts en physiologie.

Puisque l'absence de leptine ne modifie pas le nombre d'ostéoblastes, il faut assumer que, indépendamment du mécanisme impliqué, la leptine modifie la fonction de l'ostéoblaste. C'est pourquoi toutes les expériences visant à démontrer un effet autocrine, paracrine ou endocrine de la leptine, devaient être conduites en utilisant des ostéoblastes différenciés, c'est-à-dire des cellules capables de synthétiser et de déposer de la matrice osseuse. Par définition, la régulation autocrine requiert une expression de la leptine dans l'ostéoblaste. L'hybridation par Northern blot ne permettait pas de détecter une quelconque expression de la leptine dans l'os, ou des cultures primaires d'ostéoblastes, même après exposition prolongée, ce qui excluait la possibilité d'un mécanisme d'action autocrine comme mode principal d'action de la leptine sur la formation osseuse. Un mécanisme d'action paracrine ou endocrine requiert les mêmes actions : l'ostéoblaste différencié doit exprimer des récepteurs du ligand à sa surface, permettant la transduction du signal. Il y a de multiples isoformes du récepteur de la leptine, mais une seule a, jusqu'à présent, pu être identifiée, appelée *ObRb*, qui a la capacité de traduire le signal à travers la membrane cellulaire [20, 22]. *ObRb* est exprimé principalement dans quatre noyaux hypothalamiques. Nous n'avons pas été en mesure de détecter

une expression quelconque d'ObRb dans des cultures d'ostéoblastes primaires. Ce résultat était en contradiction avec ceux de Thomas et al, utilisant des cellules transformées ; de plus, il était basé sur une analyse par RT-PCR [33]. En raison de ces deux observations, nous pensons que des conditions d'expérience plus fiables, de nature biochimique, génétique et physiologique étaient requises pour répondre à cette question *in vivo*.

La transduction du signal à travers ObRb conduit à une phosphorylation de Stat 3, un facteur de transcription, et une augmentation de l'expression de gènes précoces comme *Tis11* et *C-fos* [34-38]. Une cytokine, l'oncostatine M, possède un récepteur appartenant à la même superfamille que le récepteur de la leptine, et la liaison de l'oncostatine M à ce récepteur conduit également à la phosphorylation de Stat 3 et l'expression de la réponse de gènes précoces [39-40]. De plus les récepteurs de l'oncostatine M sont présents en abondance à la surface d'ostéoblastes différenciés [41]. Ainsi donc, afin de déterminer si des récepteurs de la leptine impliqués dans la transduction du signal étaient exprimés par l'ostéoblaste, nous avons utilisé des cultures primaires d'ostéoblastes de souris sauvages, exposés soit à un véhicule, soit à des concentrations variables de leptine, soit à l'oncostatine M. Alors que l'oncostatine M induisait invariablement une phosphorylation de Stat 3 et une expression de *Tis11* et de *C-fos*, des doses variables de leptine, allant de 8 à 100 ng/ml étaient incapables d'induire une phosphorylation de Stat 3 ou de modifier l'expression de *Tis11* et de *C-fos*. Un argument génétique est également en faveur de l'hypothèse que l'ostéoblaste n'est pas une cible directe de la leptine. On peut assumer que si la phénotype osseux des souris ob/ob et des souris db/db était principalement dû à l'absence de récepteurs de la leptine impliqués dans la transduction du signal, au niveau de la surface d'ostéoblastes différenciés, des cultures d'ostéoblastes primaires de souris db/db, ayant une mutation inactivatrice d'ObRb, devraient produire plus de matrice osseuse que les cultures d'ostéoblastes primaires provenant de souris sauvages. Comme cela n'était pas le cas, il était clair que l'absence d'ObRb de l'ostéoblaste, au moins dans le modèle de la culture cellulaire utilisé, n'était pas capable d'augmenter la formation osseuse. L'ensemble de ces arguments nous indiquait, même s'il n'y avait pas de preuve formelle contre la présence d'un récepteur de la leptine impliqué dans la transmission du signal dans des ostéoblastes différenciés, que nous devions chercher ailleurs pour trouver le mécanisme d'action de la leptine sur la formation osseuse. En tout cas, nous disposons d'un argument supplémentaire, cette fois-ci de nature positive (voir plus loin), en faveur du contrôle de la formation osseuse par la leptine, et ce en l'absence de toute interaction physique avec l'ostéoblaste.

L'observation que la voie de signalisation de la leptine contrôle la masse osseuse a été faite chez des animaux mutants, ce qui signifie qu'il pourrait toujours s'agir d'un artefact génétique. On pouvait en effet imaginer que l'absence de leptine ou de sa voie de signalisation puisse stimuler l'adipocyte à sécréter une molécule qu'il ne sécrèterait pas normalement et dont la fonction serait de favoriser la déposition de matrice osseuse par des ostéoblastes différenciés. Pour examiner cette hypothèse, nous avons utilisé un autre modèle de souris, la souris « fat-free » [37]. Ces souris transgéniques expriment dans leurs adipocytes une forme dominante négative de facteurs de transcription de la famille des « leucine zipper » [39]. Parmi les facteurs de transcription du type « leucine zipper » exprimés dans l'adipocyte, il y a les protéines C/EBP qui jouent un rôle critique au cours de la différenciation adipocytaire [41]. Il en résulte que ces souris n'ont pas d'adipocytes, pas de tissu

adipeux blanc, et une réduction par un facteur 20 du taux de leptine circulante [39]. Si c'est bien les adipocytes et non pas l'absence de leptine ou de sa voie de transduction qui sont impliqués dans le phénotype de masse osseuse élevée, observé chez les souris ob/ob et db/db, alors les souris « fat-free » devraient avoir une masse osseuse normale. Si d'un autre côté une diminution, voire l'absence totale d'expression de la voie de signalisation de la leptine cause ce phénotype, indépendamment du nombre d'adipocytes, les souris « fat-free » devraient avoir le même phénotype de masse osseuse élevée que les souris ob/ob ou ob/+. Cela était précisément le cas, indiquant que c'est bien l'absence de la voie de transduction de la leptine qui était la cause de ce phénotype, et non pas les adipocytes. Les souris « fat-free » sont aussi très importantes pour une autre raison. Elles représentent un modèle animal d'une maladie humaine, la lipodystrophie généralisée, qui est caractérisée, parmi d'autres signes, par l'existence d'un phénotype de masse osseuse élevée [42].

### **La leptine agit de façon centrale pour contrôler la formation osseuse *in vivo***

Le mécanisme général suivant à examiner était le contrôle central ou neuro-endocrinien de la formation osseuse. Il était tout à fait justifié d'examiner cette voie, puisqu'on pense que la leptine contrôle l'appétit, le poids corporel et le déclenchement de la puberté, principalement à travers sa liaison à des récepteurs spécifiques localisés dans quatre noyaux de l'hypothalamus. Pour permettre d'affirmer que c'était bien cette voie-ci qui pouvait réguler la masse osseuse, il fallait remplir deux critères, l'un génétique et l'autre physiologique : 1) La perfusion intra-cérébroventriculaire (icv) de leptine à une dose ne traversant pas la barrière cérébro-méningée, devait corriger le phénotype de masse osseuse élevée chez les souris ob/ob ; 2) la même perfusion icv de leptine, cette fois-ci chez les souris sauvages, devait conduire à une ostéopénie.

En administrant des doses faibles de leptine (8 ng/h) à travers une perfusion icv chez les souris ob/ob, nous nous sommes aperçus, comme cela a déjà été montré antérieurement, que ces animaux avaient une perte de poids corporel considérable. La dose de leptine utilisée pour la perfusion icv était la même que celle utilisée pour démontrer que la leptine agissait par une voie centrale pour contrôler le poids corporel [43] ; de plus, nous nous sommes assurés qu'*il n'y avait pas de leptine détectable dans le sérum de ces animaux*. Le traitement par perfusion icv a duré un mois, un temps relativement long en terme de contrôle du poids corporel mais relativement court en terme de remodelage osseux, puisqu'un cycle de turnover osseux peut durer plus de trois mois. Néanmoins, à la fin de cette période d'un mois, les animaux ob/ob traités par de la leptine avaient perdu une quantité considérable de leur masse osseuse et présentaient maintenant une masse osseuse très légèrement inférieure à celle des animaux sauvages. Cette expérience a permis de démontrer que la leptine pouvait modifier la formation osseuse sans être présente dans le sérum, et partant dans le micro-environnement osseux. Ce résultat positif, allant de pair avec l'absence d'expression de la voie de signalisation de la leptine dans les cultures primaires d'ostéoblastes, a conduit à la découverte d'un nouveau mode de régulation du remodelage osseux, à travers un contrôle central.

Comme mentionné plus haut, il est important de démontrer que ce type de régulation, pour avoir une signification physiologique, s'observe non seulement chez

des animaux génétiquement modifiés, mais encore chez des animaux normaux. Comme déjà précisé, la perfusion icv de la même dose faible de leptine chez les souris sauvages conduisait à la survenue d'une ostéopénie, dans un laps de temps d'un mois, ce qui démontre la signification physiologique de la régulation du remodelage osseux par la leptine [27].

À présent, il n'existe pas de modèle clair et simple pour expliquer comment la leptine contrôle l'appétit, à la suite de sa fixation sur son ObRb dans l'hypothalamus [44, 45]. Il faut admettre que notre compréhension du mode d'action de la leptine dans la formation osseuse n'est pas plus avancée. Cependant, on peut essayer de se servir de l'état des connaissances actuelles en ce qui concerne le contrôle moléculaire de l'appétit, pour poser la première question. L'action de la leptine est-elle affectée par les mêmes neuropeptides pour le contrôle du couple appétit/poids corporel et pour celui de la masse osseuse ? Le neuropeptide Y (NPY) est l'un des nombreux neuropeptides stimulant l'appétit et la prise de poids corporel. L'expression de NPY est augmentée chez les souris ob/ob et un déficit en NPY corrige partiellement le phénotype d'obésité de ces souris ob/ob [46,47]. Ainsi, en ce qui concerne le contrôle du poids corporel et de l'appétit, la leptine et le NPY semblent avoir des fonctions antagonistes. Néanmoins, la perfusion icv de NPY chez des souris sauvages induisait une perte osseuse, indiquant que la leptine et le NPY ne se comportent pas comme antagonistes dans leurs fonctions du contrôle de la formation osseuse. Ce résultat peut être considéré comme une indication que la leptine utilise différents types de médiateurs pour contrôler le poids corporel et la masse osseuse.

### **La régulation neuro-endocrine de la masse osseuse n'est limitée ni aux souris ni à la leptine**

Notre étude entière rapportait initialement des observations faites chez des souris ob/ob et db/db déficientes en leptine ou son récepteur, respectivement. Elle a été ensuite étendue aux rats, avec des résultats globalement identiques. Une telle étude ne pouvait évidemment pas être effectuée chez l'homme pour plusieurs raisons. La première est que le nombre de patients est trop réduit. La seconde est que sur le plan éthique il est impossible de réaliser chez ces patients des investigations invasives, telle une biopsie osseuse. La troisième raison, qui n'est pas moins importante, est que nous avons montré que le phénotype osseux causé par l'absence de la voie de signalisation de la leptine s'aggrave avec le temps et devient réellement majeur chez l'animal adulte. En ce qui concerne les malades, il y a des enfants traités avant que le phénotype osseux attendu puisse se développer pleinement. Néanmoins, comme déjà mentionné plus haut, des patients atteints de lipodystrophie généralisée, c'est-à-dire dépourvus d'adipocytes, ont une croissance osseuse accélérée et une masse osseuse élevée [42]. De plus, la démonstration récente que des enfants ayant un déficit dans l'expression du récepteur 4 de la mélanocortine (MC-R4), ne sont pas seulement obèses, mais qu'ils ont en plus une masse osseuse élevée, est encore en faveur du concept que le poids corporel, la masse osseuse et la reproduction partagent des régulateurs neuro-endocriniens communs [48]. Cette dernière observation faite chez l'homme n'est pas incompatible avec notre propre observation que des souris jaunes Agoutis, un modèle murin d'obésité tardive secondaire à la liaison d'une protéine antagoniste au MC-R4, ne présentaient pas d'anomalie osseuse. En effet, il est bien connu que la mutation

du gène *MC-R4* est à l'origine d'un phénotype plus sévère que celui observé chez les souris jaunes Agoutis [49].

### Implications

L'observation que la leptine régule le côté formation du remodelage osseux a d'importantes implications pour la biologie de la leptine, ainsi que pour la biologie du squelette. Le fait que les souris *ob/+* et *db/+* ont déjà un phénotype de masse osseuse élevée est plutôt exceptionnel puisque dans la majorité des cas, les états d'insuffisance hormonale ne sont pas associés à un phénotype dominant. Cette observation, ensemble avec notre incapacité de démontrer une action périphérique de la leptine sur l'ostéoblaste, a plusieurs implications qui peuvent toutes être testées expérimentalement. Si la leptine n'exerce vraiment pas d'effet direct sur l'ostéoblaste, une première implication serait que l'augmentation du taux de leptine sérique devrait induire un état de résistance à la leptine, mais cela ne devrait pas induire une ostéoporose. Une deuxième implication possible est qu'en raison de la prédilection apparente de la leptine pour le squelette, la répétition de la perfusion *icv* de leptine à des doses plus faibles devrait résulter en une perte osseuse sans modifier le poids corporel pour autant. Une troisième implication, plus importante, du rôle dominant de la leptine dans la formation osseuse est qu'on pourrait parvenir à antagoniser la voie de signalisation de la leptine de façon seulement partielle, de sorte que les animaux puissent développer une masse osseuse plus élevée, sans devenir obèses ou stériles. Finalement, si la leptine utilisait des voies différentes pour contrôler respectivement le poids corporel et la formation osseuse il devrait être possible, dans des modèles d'obésité expérimentaux associés à une résistance à la leptine, d'induire une perte osseuse au moyen d'une perfusion *icv* de leptine.

En terme de biologie osseuse, les implications sont majeures. Les observations faites chez la souris, le rat et l'homme n'établissent pas seulement un nouveau concept physiologique et la base moléculaire de l'effet protecteur bien connu de l'obésité pour la masse osseuse, mais encore elles ouvrent de nouvelles voies de recherche en physiologie et pharmacologie. On doit tout d'abord se demander pourquoi les vertébrés ont besoin d'un système aussi puissant pour garantir la formation osseuse ? La réponse à cette question est naturellement très spéculative. Bien que les conséquences d'un contrôle imparfait du remodelage osseux ne deviennent pas aussi rapidement apparentes que celles d'un contrôle imparfait du poids corporel, on peut émettre l'hypothèse qu'il s'agit là d'une fonction critique dont la régulation doit être étroitement assurée durant l'évolution. Nous savons déjà que des anomalies du contrôle de la résorption osseuse peuvent résulter en une ostéopétrose, maladie létale au cours de la première enfance. De même, l'accroissement non contrôlé de la formation osseuse résulte en une augmentation considérable de la masse osseuse, c'est-à-dire l'incapacité de la moelle osseuse de maintenir une hématopoïèse normale, avec comme conséquence possible une baisse de la calcémie ; l'ensemble de ces anomalies entraînent une mort précoce [50]. Si la régulation de la formation osseuse est importante à ce point il est alors probable que la leptine ne soit pas le seul acteur et qu'il existe également une régulation positive de la formation osseuse dont le rôle serait de contrer l'action de la leptine. De même, si on se range à une telle vue globale du remodelage osseux

on peut concevoir et tester l'hypothèse selon laquelle le côté résorption du remodelage osseux serait également soumis à un contrôle hormonal central.

Finalement, s'il est encore trop tôt pour savoir si ce nouveau concept de régulation du remodelage osseux peut conduire à des approches thérapeutiques nouvelles, cette voie mérite certainement d'être explorée. Comme discuté tout le long de cette revue, trois aspects de la régulation de la masse osseuse par la leptine sont particulièrement attrayants dans cette perspective. Le premier est que la modulation de la voie de signalisation de la leptine offre la possibilité d'augmenter la formation de la masse osseuse qui est véritablement déficiente dans l'ostéoporose. On conçoit aisément qu'un traitement visant à augmenter la formation osseuse pourrait être considéré comme une cure, ou même un traitement préventif, de l'ostéoporose. Le second aspect est qu'en l'absence de leptine ou de sa voie de signalisation la formation osseuse est stimulée sans que le nombre des ostéoblastes augmente. En d'autres termes, l'absence du signal leptine ne s'accompagne pas d'un effet mitogène sur l'ostéoblaste, ce qui est clairement un avantage en considérant le traitement médical au long cours. Le troisième aspect est, comme nous l'avons déjà mentionné, que le phénotype osseux des souris déficientes en leptine est dominant alors que le phénotype de l'obésité est récessif. Cela permet d'envisager le développement d'inhibiteurs partiels de l'action de la leptine, exerçant des effets bénéfiques et sélectifs sur la masse osseuse.

## Remerciements

Nous remercions très vivement le Professeur Tilman Drüeke qui a bien voulu se charger de la traduction de ce texte.

## BIBLIOGRAPHIE

1. KARSENTY G. The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev*, 1999; **13**: 3037-3051.
2. MANOLAGAS SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*, 2000; **2**: 115-137.
3. SIMONET WS, LACEY DL, DUNSTAN CR ET AL. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997; **89**: 309-319.
4. BUCAY N, SAROSI I, DUNSTAN CR ET AL. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*, 1998; **12**: 1260-1268.
5. LACEY DL, TIMMS E, TAN HL, ET AL. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 1998; **93**: 165-176.
6. KONG YY, YOSHIDA H, SAROSI I ET AL. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*, 1999; **397**: 315-323.
7. POLI V, BALENA R, FATTORI E ET AL. Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion. *EMBO J*, 1994; **5**: 1189-1196.
8. COUSE JF, KORACH KS. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev*, 1999; **3**: 358-417.
9. POTTS JT, JÜPPNER H. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in calcium homeostasis, bone metabolism and bone development: the proteins, their genes, and receptors. *In* : L V Avioli, S M Krane. *Metabolic bone disease and clinically related disorders*. San Diego, 1998, Academic Press.

10. NICHOLSON GC, MOSELEY JM, SEXTON PM ET AL. Abundant calcitonin receptors in isolated rat osteoclasts. Biochemical and autoradiographic characterization. *J Clin Invest*, 1986; **2**: 355-360.
11. DUCY P, STARBUCK M, PRIEMEL M ET AL. A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev*, 1999; **13**: 1025-1036.
12. CORRAL DA, AMLING M, PRIEMEL M ET AL. Dissociation between bone resorption and bone formation in osteopenic transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; **95**: 13835-13840.
13. FELSON DT, ZHANG Y, HANNAN MT ET AL. Effects of weight and body mass index on bone mineral density in men and women: The Framingham study. *J Bone Miner Res*, 1993; **8**: 567-573.
14. RAVN P, CIZZA G, BJARNASON NH ET AL. Low body mass index is an important risk factor for low bone mass and increased bone loss in early postmenopausal women early postmenopausal intervention cohort (EPIC) study group. *J Bone Min Res*, 1999; **14**: 1622-1627.
15. RIGGS BL, MELTON LJ3d. Involutional osteoporosis. *N Engl J Med*, 1986; **314**: 1676-1686.
16. RIGGS BL, KHOSLA S, MELTON LJ. 3rd. A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both Type I and Type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J Bone Miner Res*, 1998; **13**: 763-773.
17. TREMOLLIÈRES FA, POUILLES JM and RIBOT C. Vertebral post-menopausal bone loss is reduced in overweight women: A longitudinal study in 155 early postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993; **77**: 683-686.
18. FRIEDMAN JM, HALAAS JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 1998; **395**: 763-770.
19. SPIEGELMAN BM, FLIER JS. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell*, 1996; **87**: 377-389.
20. CHEN H, CHARLAT O, TARTAGLIA LA ET AL. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*, 1996; **84**: 491-495.
21. CLEMENT K, VAISSE C, LAHLOU N ET AL. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature*, 1998; **392**: 398-401.
22. LEE GH, PROENCA R, MONTEZ JM ET AL. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*, 1996; **379**: 632-635.
23. MONTAGUE CT, FAROOQI IS, WHITEHEAD JP ET AL. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*, 1997; **387**: 903-908.
24. STROBEL A, ISSAD T, CAMOIN L ET AL. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet*, 1998; **3**: 213-215.
25. TARTAGLIA LA, DEMBSKI M, WENG X ET AL. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*, 1995; **83**: 1263-1271.
26. ZHANG Y, PROENCA R, MAFFEI M ET AL. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue [published erratum appears in *Nature* 1995 Mar 30; **374**(6521):479]. *Nature*, 1994; **372**: 425-432.
27. DUCY P, AMLING M, TAKEDA S ET AL. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*, 2000; **2**: 197-207.
28. DINULESCU DM, CONE RD. Agouti and agouti-related protein: analogies and contrasts. *J Biol Chem*, 2000; **275**: 6695-6698.
29. LU D, WILLARD D, PATEL IR ET AL. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature*, 1994; **371**: 799-802.
30. PARFITT AM, DREZNER MK, GLORIEUX FH ET AL. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*, 1987; **6**: 595-610.
31. AHIMA RS, PRABAKARAN D, MANTZOROS C ET AL. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, 1996; **382**: 250-252.
32. REID IR. Preventing glucocorticoid-induced osteoporosis. *N Engl J Med*, 1997; **337**: 420-421.
33. THOMAS T, GORI F, KHOSLA S ET AL. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology*, 1999; **140**: 1630-1638.

34. BAUMANN H, MORELLA KK, WHITE DW ET AL. The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996; **93**: 8374-375.
35. ELMQUIST JK, AHIMA RS, MARATOS-FLIER E ET AL. Leptin activates neurons in ventrobasal hypothalamus and brainstem. *Endocrinology*, 1997; **138**: 839-842.
36. GHILARDI N, ZIEGLER S, WIESTNER A ET AL. Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996; **93**: 6231-6235.
37. MOITRA J, MASON MM, OLIVE M ET AL. Life without white fat: a transgenic mouse. *Genes Dev*, 1998; **12**: 3168-3181.
38. VAISSE C, HALAAS JL, HORVATH CM ET AL. Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nat Genetics*, 1996; **14**: 95-97.
39. AHN S, OLIVE M, AGGARWAL S ET AL. A dominant-negative inhibitor of CREB reveals that it is a general mediator of stimulus-dependent transcription of c-fos. *Mol Cell Biol*, 1998; **2**: 967-977.
40. LEVY JB, SCHINDLER C, RAZ R ET AL. Activation of the JAK-STAT signal transduction pathway by oncostatin-M cultured human and mouse osteoblastic cells. *Endocrinology*, 1996; **137**: 1159-1165.
41. BELLIDO T, STAHL N, FARRUGGELLA TJ ET AL. Detection of receptors for interleukin-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor in bone marrow stromal/osteoblastic cells. *J Clin Invest*, 1996; **2**: 431-437.
42. WESTVIK J. Radiological features in generalized lipodystrophy. *Acta Paediatr Suppl*, 1996; **413**: 44-51.
43. HALAAS JL, BOOZER C, BLAIR-WEST J ET AL. Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997; **94**: 8878-8883.
44. ELMQUIST JK, ELIAS CF, SAPER CB. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron*, 1999; **2**: 221-232.
45. MARSH DJ, HOLLOPETER G, HUSZAR D ET AL. Response of melanocortin-4 receptor-deficient mice to anorectic and orexigenic peptides. *Nat Genet*, 1999; **1**: 119-122.
46. ERICKSON JC, HOLLOPETER G, PALMITER RD. Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. *Science*, 1996; **274**: 1704-1707.
47. SCHWARTZ MW, ERICKSON JC, BASKIN DG ET AL. Effect of fasting and leptin deficiency on hypothalamic neuropeptide Y gene transcription *in vivo* revealed by expression of a lacZ reporter gene. *Endocrinology*, 1998; **5**: 2629-2635.
48. FAROOQI IS, YEO GS, KEOGH JM ET AL. Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. *J Clin Invest*, 2000; **2**: 271-279.
49. HUSZAR D, LYNCH CA, FAIRCHILD-HUNTRESS V ET AL. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*, 1997; **1**: 131-141.
50. JOCHUM W, DAVID JP, ELLIOTT C ET AL. Increased bone formation and osteosclerosis in mice overexpressing the transcription factor fra-1. *Nat Med*, 2000; **6**: 980-984.