



Université de REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Ecole Doctorale Sciences Technologie Santé

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne

Discipline : physiologie et physiopathologie

La protéine CFTR : Implication et cible thérapeutique dans la maladie osseuse chez les patients atteints de mucoviscidose

Présentée par

M^{elle} Carole LE HENAFF

le 26 novembre 2012

Jury

Pr. Isabelle SERMET-GAUDELUS (Paris)

Pr. Marie Hélène LAFAGE-PROUST (St Etienne)

Pr. Sophie GANGLOFF (Reims)

Dr. Pierre J. MARIE (Paris)

Dr. Jacky JACQUOT (Reims)

Rapporteur

Rapporteur

Présidente du jury

Membre

Membre-Directeur de thèse

N° attribué par la bibliothèque

|| | R | E | I | | | | |

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier le professeur Marie-Hélène Lafage-Proust et le professeur Isabelle Sermet-Gaudelus d'avoir bien voulu être les rapporteurs de mon travail de thèse.

Je tiens à remercier le professeur Dominique Laurent-Maquin pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et m'avoir fait profiter de l'environnement scientifique et technique de son unité (Unité INSERM UMR-S926 – Interfaces biomatériaux et tissus hôtes). Je tiens à remercier aussi le professeur Sophie Gangloff qui a repris la direction de cette unité (devenue équipe d'accueil EA4691 – Biomateriaux et Inflammation en Site Osseux) et qui a accepté d'être la présidente de mon jury de thèse.

Je tiens à remercier le docteur Jacky Jacquot, mon directeur de thèse, pour m'avoir donné l'opportunité de me lancer dans cette aventure. Je crois que dès les premières minutes à discuter avec vous, vous m'avez fait partager votre passion pour la mucoviscidose et notamment pour votre nouveau sujet de recherche : la maladie osseuse dans la mucoviscidose. Nous avons abordé ensemble ce vaste domaine de la structure osseuse et la formation de l'os. Je voulais, tout particulièrement, vous remercier pour m'avoir fait confiance tout au long de ce travail et m'avoir encouragé et fait participer à de nombreux congrès nationaux et internationaux. Vous m'avez aussi permis d'aborder et de valoriser mon sujet de thèse, avec une grande liberté. Enfin, je voulais vous remercier pour la patience que vous avez eue avec moi.

Je tiens beaucoup à remercier les docteurs Pierre Marie et Eric Haÿ, de l'unité INSERM U606 (Hôpital Lariboisière – Paris). Pierre, je vous remercie de l'œil bienveillant que vous avez eu sur mes travaux, de votre disponibilité et vos conseils avisés et précieux. Avec Eric, vous m'avez permis de mieux appréhender le milieu osseux. J'espère que vous continuerez à suivre ma recherche sur la maladie osseuse dans la mucoviscidose avec autant d'intérêt que vous aviez montré dès notre première réunion.

Je tiens à remercier toutes les personnes du laboratoire (Mère-grand, Kiki, Binette, Fred, Flo, Halima, Marie-P, Jérôme, Julien et tous ceux qui ont été de passage) pour leur bonne humeur, leur disponibilité et leur gentillesse. Les repas mensuels de laboratoire vont me manquer...

Je tiens, tout particulièrement, à remercier Hervé Kaplan pour son soutien, sa gentillesse, son humour et son aide dans mes premiers pas au μ CT. Merci aussi à Agathe pour sa disponibilité et son aide pour la RMN...

Je remercie aussi Olivier Tabary pour ses résultats sur les flux d'ions chlorures...

Je souhaite aussi remercier le personnel de l'animalerie rémoise (Anthony et Perrine pour les gavages de souris) et le personnel de l'animalerie parisienne (Pascale pour son aide précieuse, à l'U606)

Un grand merci aussi, à tous les étudiants de thèse que j'ai eu le plaisir de rencontrer lors de ces années. Merci à Saad pour sa bonne humeur dans le bureau, ses « pétages de plomb » intéressants. Merci à Cric pour son soutien pendant les manips et l'écriture de la thèse : on est tous dans la même galère. Merci à Annelise pour son aide dans ces 2 premières années de thèse et notamment dans les manips.

Merci aux étudiants et au personnel parisiens pour leur soutien et leur aide dans mes manips. Merci à Caroline de m'avoir initiée à l'histomorphométrie et de son soutien tout au long de cette thèse. Merci à Julia et à sa phrase d'encouragement qui va devenir célèbre : « d'autres ont réussi avant nous alors pourquoi pas nous... ». Merci à Yasmine, Amélie et Thomas qui m'ont appris à mieux appréhender les congrès. Merci à Coline pour son aide dans des manips de culture cellulaire. Merci à Leila, à FX pour leur bonne humeur et leur soutien.

Un merci aussi à mes collègues de congrès (de l'unité INSERM U606) mais aussi à mes « copains/copines » de congrès qui m'ont soutenu lors de mes présentations orales : les thésardes espagnoles (Ana, Maria, ...), les thésardes portugaises (Inès et Diana) et bien d'autres encore dans bien d'autres pays (Italie, Allemagne, Canada, ...). Ce fut de très belles rencontres...

Je remercie l'association Vaincre la mucoviscidose, la région Champagne-Ardenne et l'INSERM pour leur financement tout au long de ces trois années. Je tiens aussi à remercier Mr. Morand des Laboratoires Actelion pour nous avoir fourni le miglustat. Je remercie aussi Mme Bertrand du CDTA d'Orléans, pour son soutien dans les envois de souris.

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| LISTE DES ABREVIATIONS..... | 5 |
| LISTE DES ILLUSTRATIONS..... | 7 |
| INTRODUCTION..... | 9 |
| I. La mucoviscidose | 9 |
| A. Généralités | 9 |
| 1. Historique | 9 |
| 2. Epidémiologie..... | 10 |
| 3. Diagnostique et dépistage..... | 10 |
| 4. Physiopathologie et manifestations cliniques..... | 12 |
| B. Le gène et la protéine responsable de la mucoviscidose..... | 14 |
| 1. Le gène <i>Cftr</i> | 14 |
| 2. La protéine CFTR..... | 14 |
| 3. Les mutations de la protéine CFTR..... | 20 |
| C. Les études précliniques et cliniques..... | 23 |
| 1. Les modèles animaux | 23 |
| 2. Les études cliniques..... | 26 |
| II. La physiologie osseuse | 29 |
| A. Le squelette | 29 |
| 1. Généralités | 29 |
| 2. La structure squelettique | 30 |
| B. L’histologie du tissu osseux..... | 31 |
| 1. Les cellules osseuses | 31 |
| 2. La matrice organique..... | 35 |
| 3. La partie minérale | 39 |
| 4. L’eau | 39 |
| C. Le modelage et le remodelage | 40 |

| | |
|---|------------|
| 1. Le modelage | 40 |
| 2. Le remodelage osseux | 41 |
| III. La maladie osseuse dans la mucoviscidose..... | 47 |
| A. Historique | 47 |
| B. Les facteurs impliqués et les traitements potentiels | 50 |
| OBJECTIFS..... | 52 |
| RESULTATS..... | 53 |
| I. La mutation F508del dans le gène <i>Cftr</i> réduit la masse et la formation osseuse..... | 56 |
| A. Etat des lieux | 56 |
| B. Résultats | 57 |
| 1. Etude de l'impact de la mutation F508del-CFTR sur la formation osseuse dans le modèle murin | 58 |
| 2. Etude de la production d'ostéoprotégérine par les ostéoblastes primaires humains CF hétérozygote pour la mutation F508del-CFTR | 68 |
| 3. Etude de la production d'ostéoprotégérine par les ostéoblastes primaires humains homozygote pour la mutation F508del-CFTR | 72 |
| II. Le miglustat a un effet bénéfique sur la masse et la formation osseuse dans le modèle murin F508del..... | 81 |
| A. Etat des lieux | 81 |
| B. Résultats | 82 |
| DISCUSSION ET PERSPECTIVES | 112 |
| COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES | 126 |
| BIBLIOGRAPHIE | 127 |

LISTE DES ABREVIATIONS

| | |
|------------------|---|
| ABC | ATP-binding Cassette |
| ACE | Angiotensin Converting Enzyme |
| ADN | Acide Désoxyribonucléique |
| ADNc | ADN complémentaire |
| AMPc | Adénosine MonoPhosphate cyclique |
| AP-1 | Activator Protein-1 |
| ARNm | Acide RiboNucléique messenger |
| ATP | Adénosine TriPhosphate |
| AZM | Azithromicine |
| BMP | Bone Morphogenetic Protein |
| BP | Binding Protein |
| Ca ²⁺ | ions calciques |
| CaCC | Canal chlorure dépendant du calcium |
| CF | Cystic Fibrosis (mucoviscidose) |
| CFTR | Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator |
| Cl ⁻ | ions chlorures |
| COPII | Coat-Protein complex II |
| ENaC | Epithelium Na ⁺ Channel |
| ERQC | Endoplasmique Reticulum Quality Control |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FEV | Volume expiratoire force |
| FGF | Fibroblast Growth Factor |
| GSH | Glutathion oxydé |
| IFN- γ | Interféron- γ |
| IGF-1 | Insulin Growth Factor 1 |
| I κ B | Inhibitor NF- κ B |
| IKK | I κ B Kinase |
| IL | Interleukine |
| K ⁺ | Ions potassiques |
| kDa | kilo Dalton |
| KIR | Canal K ⁺ rectifiant retardé |
| KO | Knock-Out ou invalidé |
| M-CSF | Macrophage Colony-Stimulating Factor |
| MEF | Myogenic Enhance Factor |
| MMP | Metalloprotéinase |
| MRF | Myogenic Regulator Factor |
| MSD | Membrane Spanning Domain |

| | |
|-------------------------------|---|
| Na ⁺ | Ions sodiques |
| NaCl | Chlorure de sodium |
| NBD | Nucleide-Binding Domain |
| NF-κB | Nuclear Factor kappa B |
| NHERF1 | Na ⁺ /H ⁺ Exchanger Regulatory Factor isoform 1 |
| OPG | Osteoprotegerin |
| ORCC | Outwardly Rectifying Cl ⁻ Channel |
| PGE2 | Prostaglandine E2 |
| PKA | Protéine kinase A |
| PO ₄ ³⁻ | ions phosphates |
| PON | Paraoxinase |
| PTH | Hormone Parathyroïdienne |
| RANK | Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B |
| RANKL | RANK ligand |
| RE | Reticulum Endoplasmique |
| Runx2 | Runt-related transcription factor |
| TGF-β | Transforming Growth Factor-β |
| TIR | Trypsine Immuno-Reactive |
| TMD | Domaine Transmembranaire |
| TNF-α | Tumor Necrosis Factor – alpha |
| TRAP | Phosphatase acide résistant au tartrate |
| TS | Test de la Sueur |
| VEMS | Volume Expiratoire Maximal par Seconde |
| WT | Wild-Type ou normal ou sauvage |

LISTE DES ILLUSTRATIONS

| | |
|---|-----|
| Figure 1 : Les atteintes physiopathologiques de la mucoviscidose..... | 11 |
| Figure 2 : Du gène à la protéine..... | 13 |
| Figure 3 : Structure de la protéine CFTR..... | 14 |
| Figure 4 : Biogenèse de la protéine CFTR..... | 15 |
| Figure 5 : Le mécanisme d'ouverture du canal CFTR..... | 16 |
| Figure 6 : Régulation des courants ioniques transmembranaires par la protéine CFTR..... | 17 |
| Figure 7 : Les différentes classes de mutation..... | 20 |
| Figure 8 : Le canal CFTR ayant la mutation F508del-CFTR..... | 22 |
| Figure 9 : L'os cortical et l'os spongieux..... | 29 |
| Figure 10 : Différenciation des ostéoblastes..... | 31 |
| Figure 11 : De l'ostéoblaste à l'ostéocyte..... | 32 |
| Figure 12 : La différenciation ostéoclastique..... | 34 |
| Figure 13 : L'ossification endochondrale..... | 39 |
| Figure 14 : Evolution du capital osseux au cours du temps..... | 40 |
| Figure 15 : Le remodelage osseux..... | 41 |
| Figure 16 : Mécanisme d'action de RANKL, RANK et OPG..... | 42 |
| Figure 17 : Action de l'ostéoclaste..... | 43 |
| Figure 18 : Les mécanismes physiopathologiques de l'atteinte osseuse au cours de la mucoviscidose | 48 |
| Figure 19 : Les voies de signalisation via NF- κ B au niveau de l'os..... | 116 |
| Figure 20 : Facteurs CF pouvant moduler la voie de signalisation de NF- κ B..... | 118 |
| | |
| Tableau 1 : Les différents aminoglycosides..... | 26 |
| Tableau 2 : Les « correcteurs » du canal CFTR..... | 27 |
| Tableau 3 : Les « potentialisateurs » du canal CFTR muté..... | 27 |
| Tableau 4 : Les activateurs des voies alternatives de sécrétion..... | 28 |
| Tableau 5 : Les glycoprotéines présentes dans la matrice osseuse..... | 36 |
| Tableau 6 : Impact du déficit fonctionnel de CFTR dans le métabolisme osseux..... | 48 |

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I. La mucoviscidose

A. Généralités

1. Historique

Au Moyen Âge, on connaissait le sort funeste du nouveau-né dont la mère remarquait le « baiser salé », c'est-à-dire le goût salé laissé par un baiser sur le front de l'enfant (Rochholz, 1857 ; Busch, 1990 ; Welsh and Smith, 1995).

Les premières observations cliniques apparaissent au début du XX^{ème} siècle : une insuffisance pulmonaire, des diarrhées et une anomalie pancréatique. En 1936, le Dr. Fanconi décrit, pour la première fois, chez des enfants supposés atteints de maladie cœliaque, sous le nom de « fibrose kystique du pancréas et broncheectasie » (Fanconi and Knauer, 1936 ; Harper, 1938). Grâce à des autopsies sur des nourrissons, la pédiatre américaine, Dorothy Andersen, décrit une obstruction intestinale néonatale, des complications respiratoires et digestives ainsi que des lésions histologiques spécifiques du pancréas. De plus, elle relie cette maladie à un déficit en vitamine A (Andersen, 1939 ; Andersen, 1949).

Dans les années 1940, l'appellation « mucoviscidose » fait son apparition en France à partir du terme « mucus » et « visqueux » (Quinton, 1999). En effet, la maladie est dûe à une diffusion généralisée d'un mucus visqueux (Farber *et al.*, 1943). En 1946, l'origine génétique de la maladie est établie grâce aux travaux d'Andersen et de Hodges : la mucoviscidose résulte d'une mutation autosomique récessive (Andersen and Hodges, 1946).

Le docteur di Sant'Agnese découvre et décrit, en 1953, des anomalies électrolytiques dans la sueur des malades : une augmentation importante du chlore, du sodium et moins marquée du potassium (Darling *et al.*, 1953 ; Di Sant'Agnese *et al.*, 1953). Ces observations permettent d'envisager un diagnostic spécifique à la maladie : le test de la sueur (Gibson and Cooke, 1959 ; LeGrys, 1996). Le test de la sueur devient et reste jusqu'à ce jour le test le plus couramment utilisé pour établir le diagnostic.

C'est au début des années 1980 que l'équipe de Knowles découvre, chez des patients atteints de mucoviscidose, un potentiel électrique plus électronégatif au niveau de leur muqueuse nasale (Knowles *et al.*, 1981). Cette découverte fait le lien physiologique entre les poumons, le pancréas et les glandes sudoripares. En 1983, Quinton PM montre que l'imperméabilité aux ions chlorures trouvés dans les glandes sudoripares est la cause de l'augmentation des électrolytes dans la sueur (Quinton, 1982, 1983).

En 1985, le gène *Cftr* est localisé sur le bras long du chromosome 7 grâce à un marqueur RLFP lié à la fois à la paraoxinase et à la mucoviscidose (Eiberg *et al.*, 1985 ; Tsui *et al.*, 1985), puis

isolé (Kerem *et al.*, 1989 ; Riordan *et al.*, 1989 ; Rommens *et al.*, 1989). Ce n'est qu'un peu plus tard qu'on apporte des preuves que la protéine CFTR forme bien un canal chlorure (Anderson *et al.*, 1991 ; Bear *et al.*, 1992). La découverte de l'anomalie génétique permet par la suite d'ajouter le génotypage au protocole de diagnostic, et d'envisager la thérapie génique.

2. Epidémiologie

Dans la population caucasienne, la mucoviscidose est la plus fréquente des maladies génétiques héréditaires graves. Elle touche actuellement environ un enfant sur 4 376 naissances en Europe et en Amérique du Nord et la fréquence des hétérozygotes, porteurs sains de la maladie, y est d'environ 1/25, soit 4 % de la population générale occidentale. Le nombre total de malades est de 70 000 dans le monde (www.cff.org, 2012). Plus de 45 % de la population CF est âgée de plus de 18 ans. Les hommes et les femmes sont atteints avec la même fréquence par la maladie. Par contre, l'atteinte est souvent plus grave chez les femmes (Demko *et al.*, 1995 ; Rosenfeld *et al.*, 1997 ; O'Connor *et al.*, 2002).

En France, l'espérance de vie à la naissance est passée de 5 ans en 1960, à 7 ans en 1965, 20 ans dans les années 80 et 47 ans en 2005. La précocité du diagnostic ainsi que l'efficacité des traitements symptomatiques ont permis d'augmenter l'espérance de vie des malades. Les données 2010 du Registre Français de la Mucoviscidose (5792 patients recensés) indiquent un âge moyen de décès à 29 ans (www.vaincrelamuco.org). La répartition géographique des patients montre une disparité entre les départements. Chaque année, en France, on dénombre environ 200 nouveaux cas (www.dossierfamilial.com, 06 octobre 2009).

3. Diagnostique et dépistage

En France, l'hôpital Necker – Enfants malades a créé le CFTDE (Centre de Formation au Traitement à Domicile de l'Enfant, créé en 1986) dans le souci de permettre aux enfants malades de rester dans leur milieu familial (Clairicia *et al.*, 2004). En octobre 1992, un décret est promulgué définissant l'hospitalisation à domicile comme une alternative à l'hospitalisation traditionnelle, puis le Centre de Ressources et de Compétence de la Mucoviscidose (CRCM) est mis en place, en 2002. Situé en milieu hospitalier, leurs missions sont : la confirmation et l'explication du diagnostic, la définition de la stratégie thérapeutique, la coordination des soins, et une activité de recherche (www.vaincrelamuco.org).

Le dépistage de la mucoviscidose se fait de différentes manières, avec différentes techniques :

- Le diagnostic anténatal : Il est effectué dans le cadre d'un conseil génétique pour les couples ayant déjà eu un enfant souffrant de la mucoviscidose. Si l'enfant est diagnostiqué positif, alors une interruption volontaire de grossesse peut être envisagée. Chez les couples hétérozygotes, l'analyse de l'ADN du fœtus pour une recherche de mutations, par biopsie de villosité chorale peut être réalisée de façon fiable et précoce à 12 ou 13 semaines

d'aménorrhée. Un dosage des isoenzymes de la phosphatase alcaline dans le liquide amniotique peut être réalisé par amniocentèse à 18 semaines (Roussey *et al.*, 2000 ; Flori and Doray, 2007).

- Le diagnostic néonatal : Actuellement, dans deux tiers des cas, le diagnostic de la mucoviscidose se fait avant l'âge d'un an. Le dosage de la trypsine immunoréactive (TIR) est la meilleure technique pour un dépistage néonatal (Heeley and Bangert, 1992 ; Grosskopf *et al.*, 2003 ; Deneuille and Roussey, 2007). En France, tous les nouveau-nés ont un test de la TIR (Grosskopf *et al.*, 2003). Une augmentation de la TIR peut être la conséquence d'une obstruction des canaux pancréatiques par amas de protéines *in utero* qui résulte d'une fuite des enzymes dans le sang, notamment du trypsinogène. Si le test est positif (TIR+), cela implique l'étude par génétique moléculaire ou génotypage (Décret 2000-570 du 23 juin 2000, www.legifrance.gouv.fr) à la recherche des 30 mutations du gène *Cftr* les plus fréquemment observées chez les personnes atteintes de mucoviscidose. Cette succession de tests (TIR puis génétique moléculaire) permet de diagnostiquer environ 70% des enfants atteints de mucoviscidose. Cependant, cette méthode ne permet pas de détecter toutes les mutations du gène *Cftr*. D'autres examens doivent être réalisés, en particulier un test à la sueur (TS) (Durieu and Josserand, 2008).
- Le test de la sueur : Chez les personnes atteintes de mucoviscidose, les glandes sudoripares, responsables de la production de la sueur, augmentent leurs sécrétions d'ions Na^+ , K^+ et Cl^- . Ce test de salinité a une forte valeur prédictive de la mucoviscidose. Il est largement utilisé pour diagnostiquer la maladie et confirmer une suspicion clinique. (Gibson and Cooke, 1959 ; Marchand *et al.*, 1998 ; Mishra *et al.*, 2005). Ce test est sensible, positif chez plus de 90 % des cas de mucoviscidose.
- La mesure de la différence de potentiel trans-épithélial nasal : Les transports actifs d'ions à travers l'épithélium des voies respiratoires et les glandes sudoripares génèrent une différence de potentiel (DDP) trans-épithélial qui peut être mesurée *in vivo* (Knowles *et al.*, 1981 ; Ho *et al.*, 1997 ; Middleton *et al.*, 1994 ; Domingo-Ribasa and Bosque-Garcia, 2006). Elle constitue une aide au diagnostic de mucoviscidose. Elle peut être utilisée à partir de 6 ans (Knowles *et al.*, 1995 ; Schüler *et al.*, 2004 ; Standaert *et al.*, 2004). Elle est accompagnée par des tests pharmacologiques associés destinés à mieux différencier la population malade de la population saine hétérozygote (Labbé *et al.*, 1991 ; Höfmann *et al.*, 1997).
- Le diagnostic des maladies dues à des mutations du gène *Cftr* : Le gène *Cftr* est impliqué dans d'autres pathologies qui peuvent apparaître chez le grand enfant ou chez l'adulte non CF. Ces pathologies ont été regroupées sous le nom de « CFTR-RD » pour CFTR-Related Diseases (maladies liées au gène *Cftr*) : les pancréatites chroniques, les problèmes pulmonaires non CF, l'asthme et la stérilité masculine.
- Si les mutations responsables ne sont pas détectées après utilisation de kits (détectant plus de 30 mutations, les plus courantes ; Dequeker *et al.*, 2009), l'ensemble de la séquence codante et les jonctions intron-exon du gène *Cftr* sont analysés par des techniques dites de criblage. Si une mutation est trouvée, elle est validée par une seconde technique qui peut être

le séquençage direct de la portion du gène ayant un profil anormal. Depuis quelques années, cette analyse est complétée par la recherche de grands réarrangements dans le gène *Cftr* (Taulan *et al.*, 2007 ; Des Georges *et al.*, 2008 ; Tomaiuolo *et al.*, 2008 ; Taulan *et al.*, 2009).

4. Physiopathologie et manifestations cliniques

Les manifestations cliniques de la mucoviscidose sont très hétérogènes tant entre les différentes familles qu'au sein d'une même famille (figure 1).

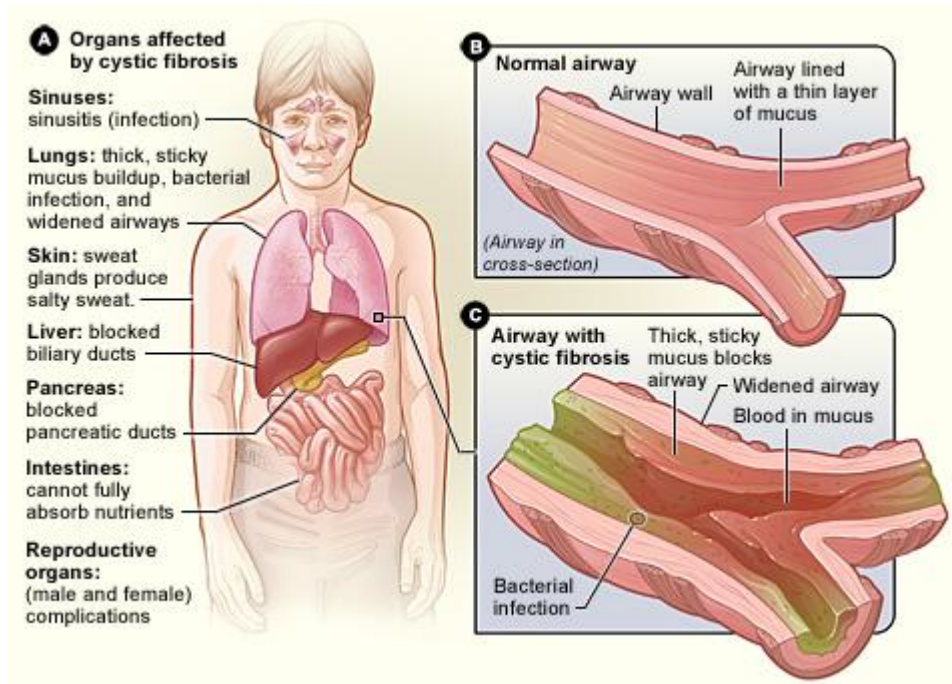


Figure 1 : Les atteintes physiopathologiques de la mucoviscidose.
(A : Les organes atteints. B : coupe des voies aériennes normales.
C : coupes de voies aériennes atteintes de mucoviscidose.)
(www.MedicineNet.com)

Cependant, les symptômes respiratoires et digestifs dominent le tableau clinique et l'atteinte pulmonaire est la cause majeure de morbidité et de mortalité : elle conditionne le pronostic vital. Malgré l'apparente normalité du système respiratoire à la naissance, les patients développent précocement des infections broncho-pulmonaires chroniques et récidivantes. Elles sont associées à une inflammation chronique et une obstruction des bronchioles due à un mucus épais, visqueux et stagnant permettant le développement de micro-organismes opportunistes (Figure 1, B et C ; Farrell *et al.*, 2008). Ceci induit des lésions pulmonaires qui s'aggravent progressivement aboutissant à une insuffisance respiratoire majeure (Farrell *et al.*, 2008).

Les affections rhino-sinusiennes sont fréquentes. La qualité du mucus dans les sinus est la même que celle des bronches. Une inflammation et une infection chronique entraînent une sinusite chronique et secondairement une polypose nasale (Ramsey and Richardson, 1992 ; Maldonado *et al.*, 2004).

L'insuffisance de fonctionnement des glandes exocrines se remarque aussi au niveau des intestins, du pancréas et du foie. Les atteintes digestives (90% des cas) sont les plus précoces et les premières historiquement décrites. Elle est surtout liée à une insuffisance pancréatique, induite par le blocage des conduits pancréatiques par ce mucus épais. Apparaissent, alors, des diarrhées et des selles graisseuses et des constipations conduisant à des occlusions intestinales. Une mauvaise absorption des vitamines liposolubles (A, D, E, K) par les intestins provoque des carences, des problèmes de minéralisation osseuse, des risques de fracture et un retard de croissance. Un diabète insulino-dépendant de type 1 peut aussi apparaître (16% des malades ; Robert, 2005 ; Elborn, 2007 ; Krysa and Steger, 2007). L'atteinte hépato-biliaire de la mucoviscidose est fréquente : 30% des patients. Mais elle n'évolue vers la cirrhose biliaire que dans environ 10% des cas. Les manifestations intestinales surviennent dès la période néonatale sous forme d'un iléus méconial chez 10 à 20 % des enfants CF (Eggermont and Boeck, 1991).

Les manifestations génitales de la mucoviscidose posent un problème de plus en plus important avec l'amélioration de la survie et le désir d'enfant des patients CF. Un retard pubertaire peut s'observer aussi bien chez les garçons que chez les filles dans les formes évoluées de la maladie. Les malades ne sont pas réellement stériles car leurs organes génitaux sont fonctionnels (Phillipson, 1998). Les hommes sont stériles dans plus de 95 % des cas, en raison d'une azoospermie obstructive (Holsclaw and Shwachman, 1971 ; Tizzano et al, 1994). Chez la femme, la fertilité est diminuée en raison de modifications physicochimiques de la glaire cervicale qui est épaissie, pauvre en eau et qui gêne la migration intra-utérine des spermatozoïdes. Néanmoins les grossesses de femmes CF ne sont plus rares (2%).

Les glandes sudoripares responsables de la transpiration sont tapissées de cellules épithéliales. Ces dernières participent au transport du sodium ainsi que des ions chlorures. Chez le patient CF, l'accumulation de ces ions va entraîner une absorption en excès des ions sodiques, il y aura donc la formation de NaCl (sel) et déshydratation qui peut être aggravée lors d'efforts ou de forte chaleur (Ballestero et al., 2006).

Les atteintes cardiaques les plus fréquentes sont secondaires à l'hypoxie. Des myocardiopathies, par fibrose, ont été décrites chez le nourrisson, probablement d'origine métabolique.

Les manifestations rhumatismales sont plus fréquentes chez l'adolescent et l'adulte, avec une prévalence estimée à 9%. Elles peuvent survenir dans l'évolution de la mucoviscidose, en premier lieu dans le cadre de l'ostéoarthropathie hypertrophiant des poumons et évoluent alors avec les poussées de surinfections pulmonaires. Ces patients montrent aussi un risque de fracture élevé. Chez 23.5% de jeunes adultes CF, la densité minérale osseuse est diminuée : le Z-score est diminué dès le plus jeune âge, chez l'enfant CF par rapport aux enfants non CF, un pic de masse osseuse inadéquate à la fin de l'adolescence (Gore *et al.*, 2010 ; Haworth *et al.*, 2010 ; Sermet-Gaudelus *et al.*, 2011)

B. Le gène et la protéine responsable de la mucoviscidose

1. Le gène *Cftr*

Une analyse de liaison a permis de localiser le gène responsable de la mucoviscidose sur le bras long du chromosome 7 au locus q31 (Tsui *et al.*, 1985) (figure 2). C'est en 1989 que trois équipes ont identifié de manière concomitante le gène *Cftr* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) par clonage positionnel (Kerem *et al.*, 1989 ; Riordan *et al.*, 1989 ; Rommens *et al.*, 1989). Ce gène se compose d'environ 250 000 paires de base et comprend 27 exons. Ces derniers sont transcrits en ARN messager de 6,5 kb (figure 2).

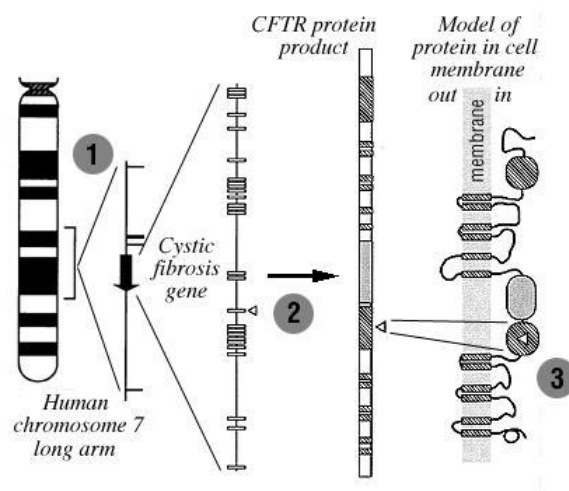


Figure 2 : Du gène à la protéine (d'après Tsui dans Science.ca)

2. La protéine CFTR

Le gène *Cftr* code une protéine CFTR membranaire responsable du flux d'ions chlorures.

a) La structure et l'expression de la protéine CFTR

La protéine CFTR est une protéine transmembranaire de 1480 acides aminés (Riordan *et al.*, 1989). Ses caractéristiques structurales ont permis de la classer dans la superfamille des transporteurs membranaires ABC (*ATP-Binding Cassette*) d'où son nom ABCC7 (Hyde *et al.*, 1990). Cette superfamille utilise l'ATP ou Adénosine Tri-Phosphate comme source d'énergie pour transporter les substrats.

Elle est constituée de 5 domaines : 2 domaines hydrophobes transmembranaires comportant chacun, 6 segments transmembranaires en hélice alpha (nommés MSD) ; et 2 domaines hydrophiles d'interaction avec les nucléotides et de liaison à l'ATP (NBD) (figure 3). Ces deux motifs (hydrophile + hydrophobe) sont reliés par un domaine régulateur (R Domain ou Regulatory Domain ; figure 3) qui contient plusieurs sérines phosphorylables par les protéines kinase A et C (Gadsby *et al.*, 2006 ; Aleksandrov *et al.*, 2007) et de nombreux résidus chargés (Sheppard and Welsh, 1999). La protéine

CFTR est la seule de la superfamille des transporteurs ABC à posséder ce domaine de régulation. La modification de ce domaine induit la régulation des ions chlorures passant la membrane plasmique.

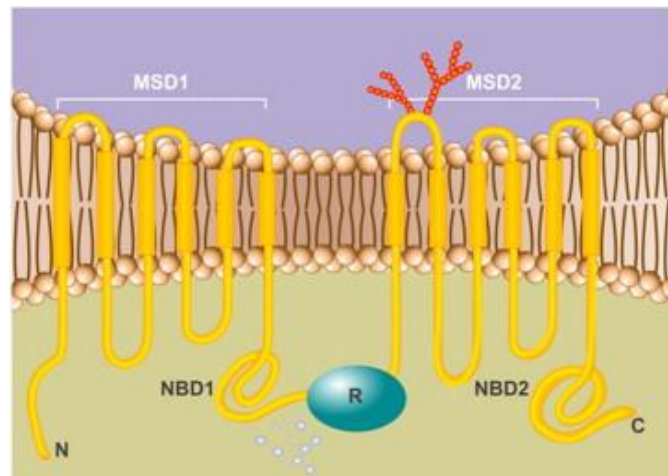


Figure 3 : Structure de la protéine CFTR (Lubamba *et al.*, 2012)

b) Biogenèse de la protéine CFTR

La maturation complète de la protéine CFTR s'effectue en environ 2 heures et pendant cette période, seulement 1/3 des précurseurs sont convertis en une protéine mature (Gelman and Kopito, 2003).

Comme la plupart des protéines, la protéine CFTR est assemblée au niveau du réticulum endoplasmique (RE) (figure 4). C'est à ce moment-là qu'elle va subir un processus de maturation complexe comprenant différentes étapes de glycosylation. La protéine CFTR est synthétisée sous forme d'un précurseur non-glycosylé ou immature sur lequel a lieu l'addition co-traductionnelle d'un oligosaccharide. Cette forme immature (ou forme A, 130kDa) est pliée et intégrée à la membrane du RE. Les cycles de repliement de la protéine CFTR sont contrôlés par le système ERQC (Endoplasmique Reticulum Quality Control) soit indirectement via des interactions avec des molécules chaperonnes, Hsp70/Hsc70, Hdj-2, Hsp90 et calnexine, soit directement via les N-glycannes indépendamment des chaperonnes, lesquelles jouent aussi la stabilité de la protéine CFTR (Glozman *et al.*, 2009). Elle est ensuite glycosylée par addition de deux groupes de glucide sur la 4^{ème} boucle extracellulaire. Cela modifie son poids moléculaire à 150 kDa. Cette nouvelle forme immature est appelée forme B. Elle quitte le RE par des vésicules « coat complex II » (COPII) (Figure 4 ; Wang *et al.*, 2004 ; Turnbull *et al.*, 2007) en direction de l'appareil de Golgi. La dernière étape de la maturation a lieu au niveau du Golgi et se traduit par une modification des groupes de glycosylation. Cette nouvelle forme mature s'appelle la forme C et possède un poids moléculaire de 170 kDa. Cette forme mature est ensuite adressée à la membrane plasmique pour y exercer ses différentes fonctions.

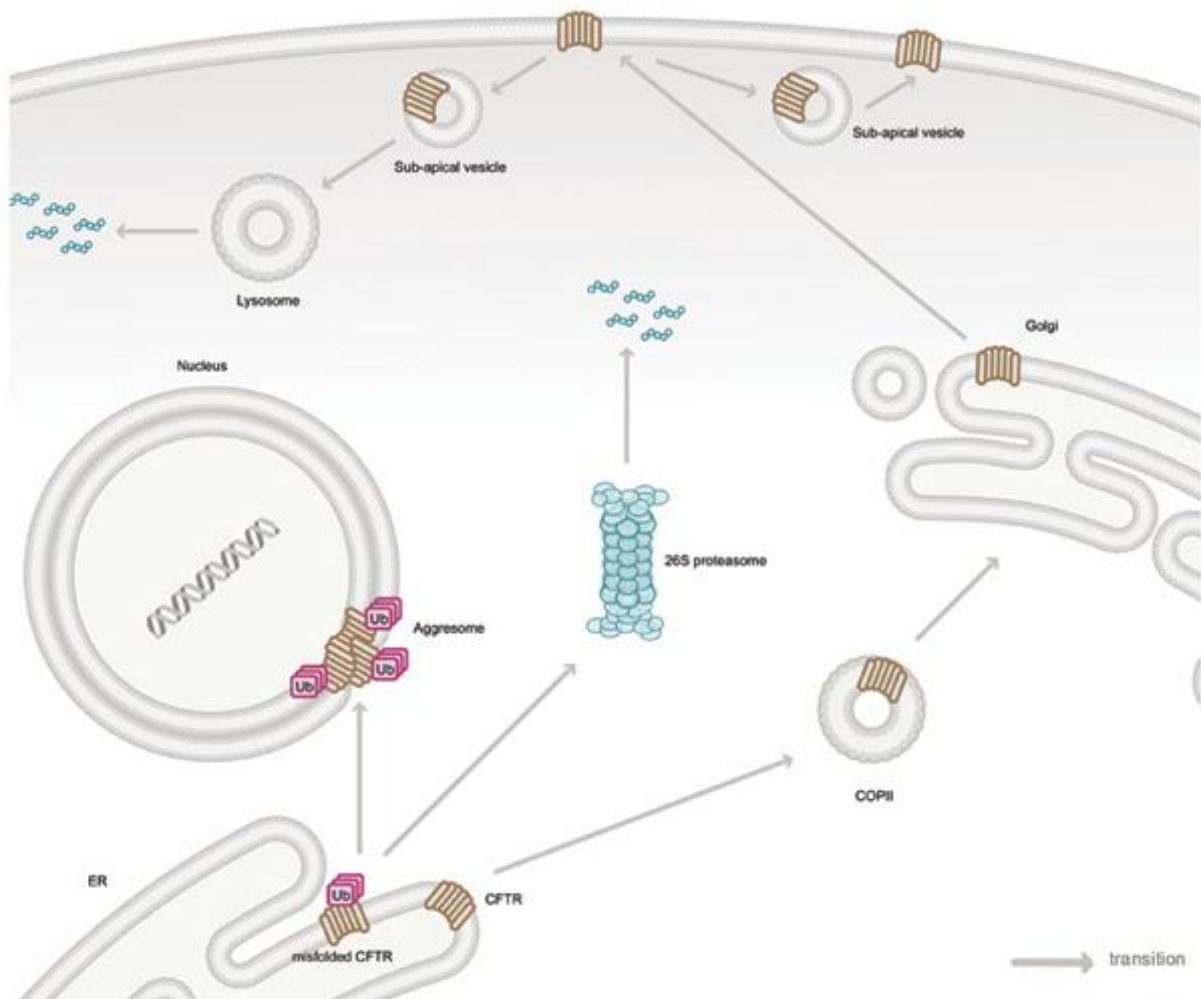


Figure 4 : Biogenèse de la protéine CFTR (d'après Turnbull *et al.*, 2007)

A la membrane, les taux de protéine CFTR sont régulés par 2 voies : l'endocytose via le recyclage de la membrane plasmique et la dégradation lysosomiale (Gelman *et al.*, 2002).

c) Le recyclage ou la dégradation de la protéine CFTR

Une grande proportion de la quantité de protéine CFTR (environ 70%) encore immature sous la forme A, est ubiquitinylée puis la protéine CFTR est dégradée par le système protéasome associé au reticulum endoplasmique (Jensen *et al.*, 1995 ; Ward *et al.*, 1995 ; Bertrand and Frizzell, 2003) (figure 4). Cependant, une étude a montré que l'efficacité du processus de maturation de CFTR varie d'un type cellulaire à l'autre (Varga *et al.*, 2004).

La demi-vie à la surface cellulaire de la protéine CFTR est très courte. En effet, CFTR est rapidement internalisée par endocytose (Lukacs *et al.*, 1997) et est recyclée à la surface et dégradée par les lysosomes et le protéasome (figure 4).

d) *Le canal CFTR, une protéine multifonctionnelle*

(1) Le canal chlorure

La principale fonction du canal CFTR est le transport des ions chlorures à travers la membrane plasmique de nombreuses cellules épithéliales telles que celles du poumon, du foie, du pancréas, du tractus digestif et de la peau. Ce transport se fait selon un gradient électrochimique.

Par analogie avec les autres protéines canalaire, on considère que les domaines transmembranaires (TMD1 et TMD2) interviennent dans la formation du pore. Alors que le domaine TMD2 est peu impliqué, le domaine TMD1 joue un rôle important dans la conductance et dans la sélectivité du canal chlorure (Devidas and Guggino, 1997). Les segments membranaires M1, M5, M6, et M12 sont impliqués dans la zone formant le pore (Schwiebert *et al.*, 1998a). La partie du pore la plus resserrée a un diamètre d'environ 5.3 Å (Hanrahan *et al.*, 1998).

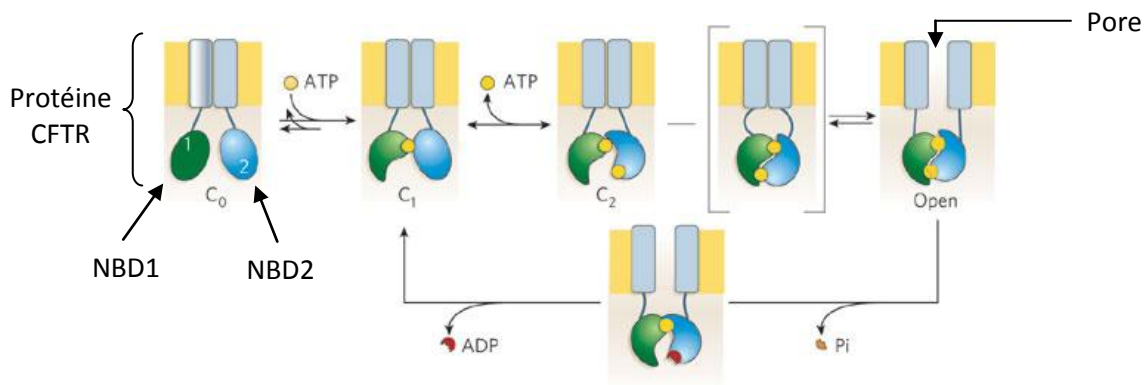


Figure 5 : Le mécanisme d'ouverture du canal CFTR (d'après Gadsby *et al.*, 2006)

C'est un canal chlorure de faible conductance régulé par la voie AMPc. L'augmentation intracellulaire d'AMPc déclenche la phosphorylation de multiples résidus sérines dans le domaine R par les protéines kinases A et C. La liaison d'une molécule d'ATP sur chacun des NBDs permet un rapprochement de ces deux domaines (figure 5). Cette interaction entraîne l'envoi d'un signal à la région transmembranaire permettant l'ouverture du canal. L'hydrolyse de l'ATP au niveau du domaine NBD2 met fin à l'interaction entre les domaines NBD1 et NBD2 entraînant la fermeture du canal (Gadsby *et al.*, 2006 ; Zhou *et al.*, 2006). L'état déphosphorylé du domaine R maintient le canal fermé. La probabilité d'ouverture dépend du nombre de sérines phosphorylées (Gadsby and Nairn, 1999). Cette phosphorylation est essentielle : le canal déphosphorylé est incapable d'hydrolyser l'ATP. Très rapidement, après la phosphorylation par les PKA, la déphosphorylation par des protéines phosphatases inactive le canal. Le domaine NBD1 est le site d'hydrolyse de l'ATP couplé à l'ouverture du canal et le domaine NBD2 est le site d'hydrolyse de l'ATP permettant la fermeture du canal (Aleksandrov *et al.*, 2002a, b).

(2) Régulateur de l'activité d'autres canaux ioniques

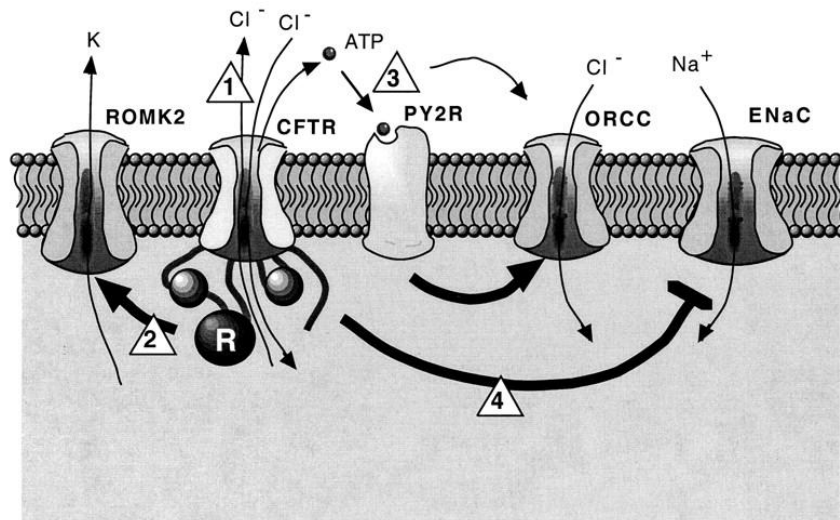


Figure 6 : Régulation des courants ioniques transmembranaires par la protéine CFTR
(Lyczak *et al.*, 2002)

La protéine CFTR régule également le transport d'autres ions via plusieurs mécanismes, d'où son nom de « régulateur transmembranaire de conductance ». (Figure 6). La liste des protéines avec lesquelles le canal CFTR interagit dans son rôle de régulateur de la conductance continue de croître et comprend des canaux, des transporteurs, et des protéines liées à l'échafaudage du cytosquelette apical des cellules épithéliales. Ces protéines sont prêtes à participer à des fonctions sécrétrices qui sont connues pour être orchestrée par la protéine CFTR.

Les enquêtes sur ces interactions ont mis en lumière l'augmentation de l'absorption de Na^+ par le canal ENaC (Epithelial Na^+ Channel) (figure 6, triangle n°4). Cette régulation se fait par la liaison de la queue C-terminale de la protéine ENaC intracellulaire domaine cytoplasmique de CFTR (NBD1 et le domaine R) (Stutts *et al.*, 1997 ; Mall *et al.*, 1998 ; Schreiber *et al.*, 1999a, b ; Lyczak *et al.*, 2002 ; Mall *et al.*, 2004 ; Boucher, 2007). Il a été démontré aussi que le canal CFTR régule la stabilité des canaux ENaC à la membrane (Lu *et al.*, 2007).

Il a été montré que la protéine CFTR régule de manière positive, via les protéines kinases, la conductance des canaux chlorures ORCC (Outwardly Rectifying Chloride Channel) (Egan *et al.*, 1992) et CIC-3 (Gentzsch *et al.*, 2003), et diminue l'activité des canaux chlorures CaCC (Ca^{2+} - activated Chloride Channel) via son domaine R (Wei *et al.*, 2001). Le canal chlorure rectifiant sortant ou l'ORCC est un canal chlorure régulé aussi par l'AMPc. La protéine CFTR est indispensable pour l'activation de ce canal (figure 6, triangle n°3). La libération d'ATP intracellulaire par la protéine CFTR activée permettrait, en effet, l'activation des canaux ORCC (Schwiebert *et al.*, 1999).

Le canal CFTR joue un rôle important dans la sécrétion d'ions bicarbonates (HCO_3^-) (Hogan *et al.*, 1997 ; Coakley *et al.*, 2003 ; Krouse *et al.*, 2004) en permettant leur transport (Devor *et al.*, 1999 ; Ishiguro *et al.*, 2009) mais aussi en stimulant probablement le canal échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Choi *et al.*, 2001) ou en inhibant le co-transporteur NBC-1 ou $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (Park *et al.*, 2002).

Le domaine R ou domaine régulateur du canal CFTR permet, aussi, une régulation du canal potassique ROMK2 (figure 6, triangle 2). De même, la protéine CFTR confère une sensibilité sulfonylurée sur le canal K⁺ de rectification, vers l'intérieur du rein, ROMK2, par interaction avec le NBD1 et R domaines, ainsi que le premier domaine transmembranaire, de CFTR.

La protéine CFTR semble jouer un rôle dans le transport de l'eau à travers la membrane. En effet, une interaction entre la protéine CFTR et les aquaporines, des canaux perméables à l'eau, a été mise en évidence au niveau de la cornée (Hamann, 2002), du pancréas (Burghardt *et al.*, 2003). Récemment, les travaux de Pietrement C ont montré que l'interaction entre l'extrémité C-terminal de la protéine CFTR, le motif PDZ de la protéine NHERF1 et l'aquaporine 9, facilite l'activation de l'aquaporine par l'AMPc (Pietrement *et al.*, 2008).

Il existe d'autres canaux chlorures à la surface de la membrane apicale comme le canal chlorure dépendant du calcium (CaCC). Ce dernier pourrait être influencé par la protéine CFTR via le récepteur PY2R (figure 6, triangle 3) qui nécessite une molécule d'ATP. Le CaCC pourrait aussi jouer un rôle dans la régulation du pH du liquide de surface de l'épithélium et un rôle de compensation dans la sécrétion d'ions chlorures chez la souris invalidée ou Knock out pour CFTR (Nilius and Droogmans, 2003)

La protéine CFTR est non seulement capable de réguler directement ou indirectement d'autres canaux ioniques, mais peut aussi avoir des effets modulateurs agonistes et antagonistes sur d'autres protéines. L'une de ces protéines est le canal K⁺ sensible à l'ATP, qui fait partie d'un sous-groupe de la superfamille des canaux K⁺ rectifiant entrants (KIR). Les canaux KIR sont localisés sur la membrane basolatérale des cellules épithéliales respiratoires, où ils interviennent dans le recyclage du potassium (Loussouarn *et al.*, 1996).

(3) Les autres fonctions de la protéine CFTR

D'autres fonctions pour CFTR ont été décrites comme le transport d'ATP, la modulation des phénomènes d'exocytose et d'endocytose, la régulation du pH des organelles intracellulaires. Le canal CFTR est non seulement perméable aux ions chlorures, mais également au glutathion réduit (GSH) (Linsdell and Hanrahan, 1998 ; Kogan *et al.*, 2003).

Différentes études ont émis l'hypothèse que la protéine CFTR aurait un rôle dans la défense anti-infectieuse via son domaine extracellulaire qui servirait de récepteur pour les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella enterica* (Pier *et al.*, 1998 ; Lyczak and Pier, 2002). Ces travaux n'ont pas été confirmés.

Une transactivation du facteur de transcription nucléaire NF-κB résultant du dysfonctionnement de CFTR (Tabary *et al.*, 2001) et l'observation de taux élevés d'IL-8 dans les voies respiratoires (Vij *et al.*, 2006 ; Perez *et al.*, 2007) ont suggéré un rôle de la protéine CFTR dans la réponse inflammatoire. Les travaux de Boncoeur E. *et al.* ont montré que la protéine CFTR contrôle la dégradation et l'activité transcriptionnelle de NF-κB en réponse à un stress oxydatif (Boncoeur *et al.*, 2008). Une étude plus récente vient de montrer que la surexpression de la protéine CFTR induit une

répression de l'activité transcriptionnelle basale des promoteurs IL-8 et NF- κ B et de celle qui est induite par la cytokine IL-1 β (Vij *et al.*, 2009).

Le rôle joué par la protéine CFTR dans la réaction inflammatoire, qui semble agir de façon très précoce, reste encore méconnu.

La protéine CFTR a également un rôle dans le développement du tissu pulmonaire, non seulement dans la différenciation des cellules bronchiques, mais aussi dans leur prolifération (Larson and Cohen, 2006). La protéine CFTR influencerait la contraction musculaire via un mécanisme indépendant des Rho-kinases qui implique l'ATP et le calcium (Larson and Cohen, 2006). Dans une étude plus récente, les mêmes auteurs ont été montrés que la protéine CFTR joue un rôle dans l'organogenèse pulmonaire en modulant l'expression du peptide relié à l'hormone parathyroïdienne (PTH-rP) et la voie de signalisation Wnt/ β -caténine (Cohen *et al.*, 2008).

D'autres travaux ont montré que l'homéostasie du calcium est affectée dans les cellules des muscles lisses des voies respiratoires chez les patients CF, suggérant un rôle de la protéine CFTR dans la régulation du calcium intracellulaire (Michoud *et al.*, 2009).

Au niveau cardiaque, la protéine CFTR semble moduler la durée du potentiel d'action (Tominaga *et al.*, 1994). De plus, la stimulation des récepteurs β_3 diminue le potentiel d'action dans les myocytes de patients normaux et n'a pas d'effets chez les patients CF (Leblais *et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent un rôle de la protéine CFTR dans la contraction musculaire cardiaque.

La protéine CFTR intervient également dans le recyclage des membranes en favorisant les phénomènes d'exocytose et en inhibant ceux d'endocytose (Ameen *et al.*, 2007). L'absence de protéine CFTR normale pourrait ainsi être associée à une diminution de l'expression membranaire d'autres canaux.

La protéine CFTR régule aussi le pH intracellulaire et acidifie les compartiments intracellulaires. Son dysfonctionnement a pour conséquence de modifier les sécrétions cellulaires et d'augmenter la viscosité du mucus. On observe, en particulier, un défaut de sialylation des mucines, ce qui ferait apparaître des récepteurs spécifiques pour *P.aeruginosa*.

3. Les mutations de la protéine CFTR

Depuis la découverte du gène codant la protéine CFTR en 1989, plus de 1600 variations de séquence ont été identifiées et référencées (www.genet.sickkids.on.ca). Dans l'ensemble des mutations recensées, 40% sont des mutations faux sens, 18% sont des mutations non-sens, 18% des mutations altèrent des codons essentiels pour l'épissage, 22% des mutations modifient le cadre de lecture. Les 2% restant correspondent à des mutations localisées dans le promoteur ou à des délétions dans le cadre de lecture (Rowe *et al.*, 2005).

a) Les classes de mutations de la protéine CFTR

Les mutations sont réparties en 6 classes sur la base du mécanisme responsable du dysfonctionnement du canal CFTR (Figure 7). Cette classification a été proposée par Welsh et Smith en 1993 (Welsh and Smith, 1993).

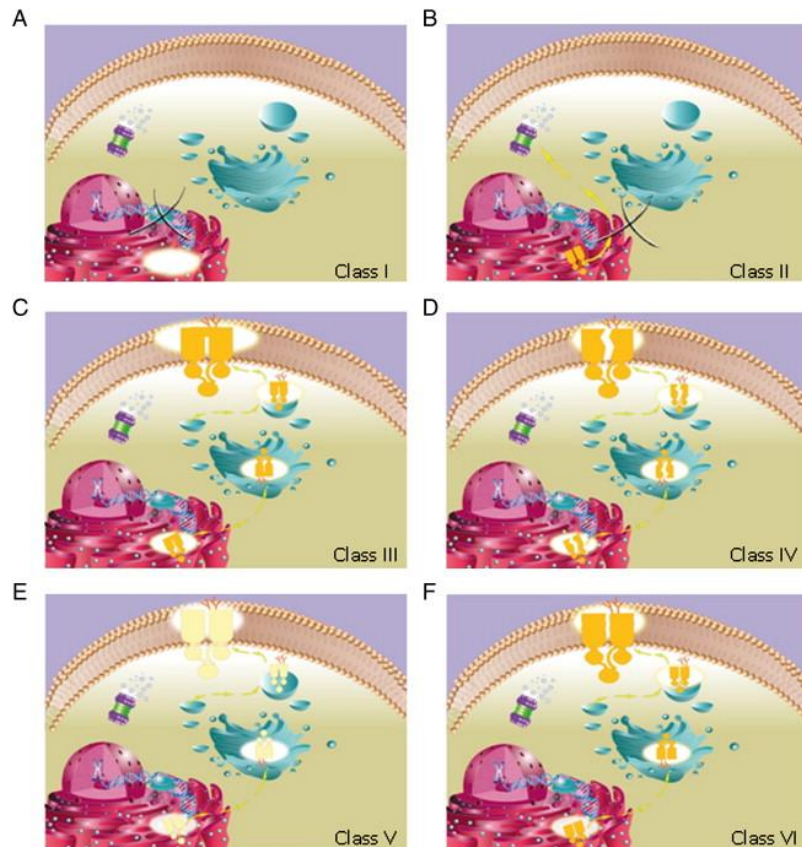


Figure 7 : Les différentes classes de mutations (Lubamba *et al.*, 2012)

La Classe I regroupe les mutations entraînant la présence d'un codon stop prématuré conduisant à la terminaison prématurée de la traduction de l'ARNm, à la production d'un ARNm instable, à la synthèse d'une protéine tronquée non fonctionnelle et rapidement dégradée. Ces mutations représentent 5 à 10% des mutations répertoriées chez les patients CF. La 2nde mutation la plus commune, G542X, appartient à cette classe.

Les mutations de la Classe II incluant la mutation la plus fréquente F508del-CFTR affectent la maturation de la protéine CFTR. Ces mutations conduisent à des défauts de lecture ou à des délétions d'acide aminé. La protéine mal conformée, avec un défaut de repliement, est retenue dans le réticulum endoplasmique pour y être dégradée par le protéasome après être prise en charge par le système ubiquitine. Dans ce cas, très peu de protéines fonctionnelles arrivent à la membrane plasmique.

La Classe III regroupe les mutations qui affectent la régulation du canal chlorure. Ces mutations induisent des défauts de lecture ou des mutations par changement d'acide aminé. Ces mutants sont correctement synthétisés et localisés, mais résistent à la phosphorylation ou à la liaison

de l'ATP au niveau des domaines NBD. Le canal n'est pas activé par la protéine Kinase A ou ne fonctionne pas. Dans cette classe, la mutation G551D, 3^{ème} mutation la plus fréquente, est située dans le domaine NBD. Elle interfère aussi avec l'hydrolyse de l'ATP.

Les mutations de la Classe IV affectent la conductance du canal chlorure, induit par un défaut de lecture ou un « échange » d'acide aminé. La protéine mutée génère une diminution du courant chlorure consécutive à une altération du flux ionique ou à une diminution de la probabilité d'ouverture du canal (ex : R117H, R347P, R334W).

La Classe V comprend les mutations situées dans le promoteur. Elles affectent l'épissage engendrant une diminution significative du taux de transcrits normaux par altération de la stabilité des ARNm. Les transcrits sont soit corrects ou de longueur aberrante mais le niveau de transcrits varie entre les patients et aussi entre les différents organes pour un même patient. Dans cette classe, la synthèse protéique diminuée peut être due soit à des défauts de lecture, soit à des « échanges d'acide aminé » (ex : A445E), soit à des problèmes de maturation des ARNm.

La Classe VI, apparue récemment, regroupe des mutations altérant la stabilité de la protéine CFTR au niveau membranaire et modifiant la régulation d'autres canaux (Haardt *et al.*, 1999 ; Rowe *et al.*, 2005).

b) La mutation F508del-CFTR

Plusieurs études ont tenté de déterminer l'âge et le lieu d'origine des principales mutations responsables de la mucoviscidose par analyse génétique de différentes populations. L'ancienneté de la mutation F508del-CFTR reste très controversée (Serre *et al.*, 1990 ; Morral *et al.*, 1993 ; Morral *et al.*, 1994 ; Reich and Lander, 2001 ; Wiuf, 2001) entre - 3 000 ans et le pré-néolithique.

Dans les populations caucasiennes et nord-européennes, la mutation F508del-CFTR apparaît avec une fréquence allélique de 70%. Il existe un gradient nord-ouest/sud-est avec, par exemple 88% de F508del-CFTR au Danemark et 50% en Italie. Dans la population française, la principale mutation F508del-CFTR représente approximativement 65-70% des allèles CF, avec de fortes variations régionales allant de 64% en Languedoc-Roussillon à 81% en Bretagne occidentale. Cette fréquence élevée suggère l'existence possible, dans les populations nord-européennes, d'un mécanisme de sélection des hétérozygotes (Baxter *et al.*, 1988 ; Morral *et al.*, 1994). Cette mutation représente 48% des allèles CF dans la population afro-américaine et 30% dans les populations américaines d'origine asiatique (Bobadilla *et al.*, 2002).

La mutation F508del-CFTR est la plus commune dans tous les groupes ethniques. Il s'agit, en fait, d'une délétion de 3 bases (CTT) au niveau de la phénylalanine à la position 508 (Figure 8). La mutation F508del-CFTR est une mutation de classe II, localisée dans le domaine NBD1 (codé par l'exon 10). Elle perturbe la maturation de la protéine CFTR, en empêchant sa glycosylation et son routage vers la membrane cytoplasmique des cellules épithéliales.

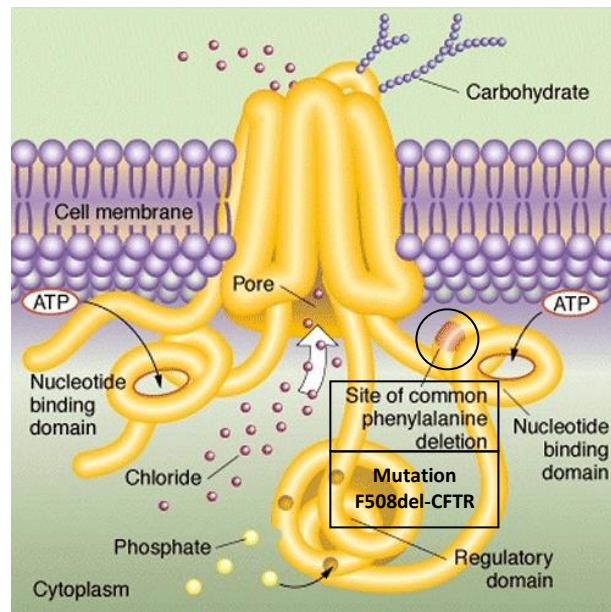


Figure 8 : Le canal CFTR ayant la mutation F508del-CFTR (www.pneumo-adept2.org)

A l'état homozygote, la mutation F508del-CFTR est associée à la forme classique de la maladie avec une augmentation des électrolytes dans la sueur, une insuffisance pancréatique et une atteinte obstructive des poumons le plus souvent sévère.

C. Les études précliniques et cliniques

1. Les modèles animaux

Les modèles animaux permettent d'aborder les mécanismes physiopathologiques de la maladie, l'identification des gènes et des facteurs environnementaux modifiant la sévérité du phénotype, l'expérimentation de nouvelles stratégies pharmacologiques modifiant la sévérité de la maladie et l'étude de protocoles de thérapie génique corrigeant la défaillance du transport ionique (Grubb and boucher, 1999).

a) Le modèle murin CF

Dès 1992, trois ans à peine après la découverte du gène *Cftr*, le premier modèle de souris transgénique est créé par ciblage génétique : des souris « knock-out » pour CFTR (Clarke *et al.*, 1992 ; Snouwaert *et al.*, 1992). Elles présentent à l'état homozygote de nombreux symptômes communs avec les jeunes patients humains : une stérilité, un iléus méconial, des altérations des glandes muqueuses et séreuses, et des obstructions des structures glandulaires. En général, les souris KO-CFTR décèdent au bout de 3-4 semaines en raison d'une sévère obstruction intestinale. Ces souris n'ont pas d'inflammation chronique, ni d'infection pulmonaire (Dif *et al.*, 2004 ; Haston *et al.*, 2008). Ces souris présentent aussi une réduction du taux plasmatique d'IGF1 et de l'ostéocalcine.

Toutes ces observations ont été aussi retrouvées chez les patients atteints de mucoviscidose par l'équipe de Haworth (Haworth *et al.*, 2000).

Le modèle de souris KO-CFTR a été réalisé dans différentes souches : BALB (Dif *et al.*, 2004 ; Haston *et al.*, 2008) et C57BL/6 (Pashuck *et al.*, 2009). On note un phénotype CF plus ou moins marqué en fonction de la souche de souris.

Par la suite ont été décrits de nombreux autres modèles murins modifiés génétiquement, de façon à entraîner soit une absence complète d'expression de CFTR (souris KO), soit l'expression d'un gène *Cftr* muté (exemple : souris F508del-CFTR). Ces modèles animaux présentent des similitudes, mais aussi des différences avec la maladie humaine : ainsi la plupart développent des anomalies du transport ionique et des symptômes digestifs similaires à l'homme, mais ne présentent pas les lésions pulmonaires caractéristiques retrouvées chez les patients humains CF, alors que l'atteinte digestive leur sont en général fatale (Grubb and Boucher, 1999).

Afin de contourner cette absence de déficit respiratoire, des modèles de souris, différemment sensibles à certains pathogènes respiratoires, ont été créés, permettant de mettre en évidence une susceptibilité augmentée pour ces pathogènes chez les souris déficientes en CFTR (Stotland *et al.*, 2000).

Un autre modèle a été créé : les souris F508del-CFTR. L'équipe de Scholte B *et al.* a généré ce modèle en 1995 (van Doorninck *et al.*, 1995). Ces souris montrent un phénotype typiquement CF : un poids diminué, une maladie intestinale aboutissant à une obstruction intestinale non létale, une diminution de la densité minérale osseuse (Paradis *et al.*, 2010). Par contre, aucune accumulation de mucus dans les poumons, le pancréas, les canaux biliaires, les glandes salivaires ou les canaux déférents n'a été observée, bien que ce canal F508del-CFTR présente une électrophysiologie CF. Apparemment, il y aurait une activité résiduelle de la protéine F508del-CFTR : le taux d'ARNm est normal, leur maturation est anormale avec un transport à la membrane non efficace, l'activité du canal semble normale (French *et al.*, 1996).

Après 15 ans de recherche d'un modèle animal permettant d'étudier la physiopathologie de l'atteinte pulmonaire de la mucoviscidose, Mall et coll. décrivent en 2004 un nouveau modèle murin présentant un phénotype respiratoire très proche de celui retrouvé dans la mucoviscidose chez l'homme. Pour créer ce modèle, ils se sont basés sur la surexpression du canal aux ions sodiques, ENaC contrôlé par CFTR, et non sur la déficience du CFTR (Mall *et al.*, 2004). Leur modèle montre une altération de la clearance muco-ciliaire entraînant une inflammation bronchique, et celle-ci précède une infection chronique.

b) Le modèle cochon CF

Dans un souci de se rapprocher de plus en plus de l'Homme, un modèle de cochon CF a été développé dans les années 2008 (Ostedgaard *et al.*, 2011 ; Pezzulo *et al.*, 2012).

Le génome porcin comprend 18 chromosomes autosomes et 2 chromosomes sexuels ayant la même complexité et la même taille que les chromosomes humains. Les premiers cochons transgéniques ont été décrits dans les années 80. Ils ont une période de gestation de 114 jours et atteignent la maturité sexuelle entre 6 et 8 mois.

L'équipe de Rogers a créé des cochons KO-CFTR (insertion d'un codon stop dans l'exon 10 du gène *Cftr*, au niveau de l'acide aminé 508) et F508del-CFTR, en 2008. Les poumons des cochons sont actuellement très étudiés afin de comprendre les mécanismes induisant des pathologies pulmonaires humaines et les thérapies possibles. En effet, les poumons de cochon montrent une anatomie, une histologie, une biochimie et une physiologie très comparables aux poumons des humains (Rogers *et al.*, 2008a, b, c).

Song *et al.* ont étudié les cellules épithéliales, les sécrétions de mucus et la fonctionnalité de certains canaux au niveau des trachées porcines et humaines (Song *et al.*, 2009).

A la naissance, ces animaux sont dépourvus d'inflammation mais avec le temps, ils développent une maladie pulmonaire spontanée, une inflammation, une surproduction de mucus, une obstruction des voies aériennes, une infection et des problèmes digestifs (Meyerholz *et al.*, 2010 ; Rogan *et al.*, 2010 ; Stoltz *et al.*, 2010). Par contre, il n'y a pas d'hyperabsorption d'ions sodiques dans les cochons nouveau-nés (Chen *et al.*, 2010). Comme chez les humains, à la naissance, ces cochons montrent aussi une diminution de la production d'IGF-1 et une nette diminution de la densité minérale osseuse (Rogan *et al.*, 2010).

c) *Le modèle furet CF*

Un autre modèle a été développé : le furet CF (*Mustela putorius furo*) (Keiser and Engelhardt, 2011). C'est un modèle potentiellement intéressant pour deux raisons : leur anatomie pulmonaire ainsi que les cellules pulmonaires qui en découlent sont très proches de l'humain, et ils se reproduisent assez rapidement (42 jours de gestation et la maturité sexuelle à 4-6 mois).

Leurs glandes de la sous-muqueuse au niveau de la trachée, expriment la protéine CFTR de manière abondante, ce qui facilite la fluidité et la sécrétion de mucus. Ces structures semblent jouer un rôle important dans la protection du système respiratoire contre les infections et leurs distributions peuvent être importantes dans la maladie CF. Pour ces raisons, l'équipe d'Engelhardt *et al.* a développé des furets hétérozygotes pour une délétion de l'exon 10 du gène *Cftr* (en utilisant un adeno-virus) et des nouveau-nés furets KO-CFTR. Ces derniers développent plusieurs pathologies observées chez l'homme : une maladie digestive (pancréas, intestin, foie), une nutrition insuffisante, des prédispositions aux infections pulmonaires. Tous ces symptômes s'observent très précocement, chez le nouveau-né (Sun *et al.*, 2010). Ces chercheurs ont utilisé ces furets pour l'étude des trachées et des glandes de la sous-muqueuse. Ils ont aussi créé des furets KO-CFTR corrigés au niveau intestinal afin d'éviter un décès prématuré induit par une obstruction intestinale.

2. Les études cliniques

Au début des années 1990, une vague d'enthousiasme suit l'identification du gène *Cftr*. Certains patients pensent qu'un traitement curatif a été découvert. Des traitements pharmacologiques alternatifs ou complémentaires destinés à améliorer la fonction du canal CFTR sont également en cours d'étude (Rodgers and Knox, 2001). Actuellement, la NACFF (North-America Cystic Fibrosis Foundation) en liste une trentaine en développement, dont beaucoup ciblent l'infection et l'inflammation et un tiers des molécules listées ciblent la correction de la déficience du transport ionique soit par thérapie génique soit par thérapie protéique.

a) Thérapie génique

La mucoviscidose est une maladie mono génétique, c'est-à-dire ne concerne qu'un seul gène. Les mutations de ce gène conduisent à une absence ou à une protéine CFTR défectueuse. De grands espoirs de guérison sont nés avec l'apparition du concept de la thérapie génique. En effet, la voie logique pour restaurer une activité normale du canal CFTR est de remplacer ce gène ou de le réparer (O'Sullivan and Freedman, 2009).

Le premier grand objectif de la thérapie génique est d'apporter suffisamment de copies de « gène » normal dans les cellules malades. Le deuxième objectif est de parvenir à l'expression de ce gène, de sorte que la protéine CFTR normale soit formée et exprimée à la membrane des cellules. Cette expression doit aussi avoir une durée de vie importante dans les différents organes. Or les cellules se régénèrent plus ou moins rapidement : la thérapie génique a donc peu de chance de fonctionner en une seule fois et en une seule administration.

Par exemple, au niveau du poumon, les cellules saines ont révélé un nombre extrêmement faible d'ARNm codant la protéine CFTR. En théorie, il serait possible de restaurer une fonction de sécrétion normale dans les cellules pulmonaires en apportant quelques copies du gène sain intégré dans un vecteur (Crystal *et al.*, 1994 ; Joseph *et al.*, 2001).

Une approche de la thérapie génique prometteuse est basée sur l'utilisation d'adénovirus. Ce vecteur choisi infecte de manière sélective les cellules pulmonaires.

En 1997, lors d'un essai clinique de phase I, Bellon G *et al.* ont montré un transfert efficace du gène *Cftr* dans les voies aériennes des patients CF par une infusion de virus transformés. Mais aucune différence des paramètres immunologiques et inflammatoires n'a été observée dans le sérum et les lavages broncho-alvéolaires des malades (Bellon *et al.*, 1997). Deux autres études ont été réalisées sur des patients CF, avec une amélioration du volume expiratoire forcé après 30 jours de traitement (Moss *et al.*, 2004) et une diminution de la concentration d'IL8 dans les expectorations (Interleukine 8 pro inflammatoire). Par la suite, une autre étude a confirmé l'innocuité du vecteur, mais sans effet sur la fonction pulmonaire (Moss *et al.*, 2007).

Malgré un principe relativement simple, la thérapie génique bute sur plusieurs points (Kennedy, 2002 ; Weiss and Pilewski, 2003). Le système immunitaire du patient lutte contre le vecteur adénoviral et le détruit. En outre, les cellules ayant intégré le transgène expriment des protéines du virus et sont donc

identifiées puis éliminées par le système immunitaire. De par la présence d'un mucus bronchique épais, la pénétration de l'adénovirus dans les cellules cibles est considérablement ralentie. Par ailleurs, le transgène n'est pas intégré de manière définitive dans les cellules cibles et il est assez rapidement éliminé. Ainsi, O'Sullivan BP et Freedman SD, dans leur revue de 2009, indiquent que la thérapie génique relève plutôt de l'espoir que de la réalité (O'Sullivan and Freedman, 2009).

b) Thérapie protéique

Les difficultés techniques pour développer une thérapie de remplacement efficace et non-néfaste ont amené à rechercher d'autres approches alternatives. Ces approches impliquent une thérapie spécifique de la mutation. Le but est, donc, de corriger, spécifiquement, le défaut génétique selon les différentes classes ou selon le mécanisme moléculaire par lequel les mutations entraînent un défaut de production ou de fonction de la protéine CFTR (Kerem, 2006). La thérapie protéique utilise la pharmacologie (Cystic Fibrosis Foundation ou www.cff.org).

(1) Les aminoglycosides

Les mutations de classe I concernent moins de 10% de la population malade mondiale mais dans certains pays comme l'Israël, ce pourcentage est considérablement augmenté pour atteindre environ 60% de la population CF. Il est connu depuis quelques années que les antibiotiques aminoglycosides, en plus de leur activité anti-microbienne, peuvent passer outre le codon stop formé par la mutation sur le gène *Cfr* et ainsi permettre la production d'une protéine normale (Howard *et al.*, 1996 ; PTC therapeutics, www.ptcbio.com, 2011 ; Lubamba *et al.*, 2012) (tableau 1).

| | Mécanisme d'action | thérapie | Effets 2 nd aires | clinique |
|-----------------------|--|----------|--|--|
| La gentamicine | antibiotique | classe I | surdité perte de l'équilibre néphrotoxique | Bedwell <i>et al.</i> , 1997 Clancy <i>et al.</i> , 2001 Sermet-Gaudelus <i>et al.</i> , 2007 Lubamba <i>et al.</i> , 2012 |
| PTC124 | gentamicine-dérivé pas de fonction antibiotique | classe I | | phase III Clancy <i>et al.</i> , 2007 Linde <i>et al.</i> , 2007 Welch <i>et al.</i> , 2007 Sermet-Gaudelus <i>et al.</i> , 2010 Wilschanski <i>et al.</i> , 2011 |

Tableau 1 : Les différents aminoglycosides

(2) Les correcteurs de la protéine CFTR

Dans la dernière décennie, deux nouvelles classes de molécules ont fait leur apparition en tant que molécules potentiellement thérapeutiques dans la mucoviscidose : « les correcteurs et les potentiateurs » (Van Goor *et al.*, 2006). Les molécules « correctrices » sont conçues pour permettre à la protéine CFTR mutée de « court-circuiter » le système de contrôle de qualité endogène de la

cellule, d'empêcher son blocage prématuré par l'appareil de golgi et de parvenir à la membrane (tableau 2).

| | Mécanisme d'action | thérapie | clinique | |
|--------------------------------|---|-----------|----------------------------|--|
| Butyrates et analogues | Neutralisation partielle du défaut de transfert protéique | Classe II | | Cheng <i>et al.</i> , 1995 Zhang <i>et al.</i> , 2003 |
| Sodium 4-phénylbutyrate | Augmentation de CFTR à la membrane | Classe II | | Rubenstein <i>et al.</i> , 1997 |
| Curcumin | Inhibition de la cyclooxygénase Inhibition de NFκB | | effets discutables | Mall and Kunzelmann, 2005 |
| Sildénafil et analogues | Correction du trafic de CFTR muté ... | Classe II | | Robert <i>et al.</i> , 2008 |
| Miglustat | Inhibiteur de la glucosylcéramide | Classe II | commercialisé "Zavesca" | Abian <i>et al.</i> , 2011 Norez <i>et al.</i> , 2009 |
| VX-809 | Amélioration de la maturation protéique Augmentation du trafic de CFTR Diminution de la sensibilité protéolytique | Classe II | phase lia | Van Goor <i>et al.</i> , 2011 Clancy <i>et al.</i> , 2012 |

Tableau 2 : Les « correcteurs » du canal CFTR muté

Le miglustat (1-butyl-2-(hydroxyméthyl) piperidine-3,4,5-triol, OGT 918, N-butyl-désoxynojirimycine) est une molécule développée par les Laboratoires Actelion (Suisse). Il est commercialisé sous le nom de Zavesca®. Il est principalement utilisé pour traiter la maladie de Gaucher de type 1 (Pastores *et al.*, 2007), la maladie de Niemann-Pick de type C et la maladie de Tay-Sachs, en particulier d'apparition tardive de Tay-Sachs (Neudorfer and Kolodny, 2004). Le miglustat est un imino-sucre de poids moléculaire de 219 daltons. C'est un analogue synthétique du D-glucose (Abian *et al.*, 2011), inhibiteur de la glucosylcéramide synthase. Le miglustat possède la capacité d'accéder à des organes profonds tels que le cerveau, les os et le poumon. Le miglustat restaure, *in vitro*, l'activité chlorure dépendante de CFTR dans les cellules épithéliales respiratoires (Norez *et al.*, 2006 ; 2009). *In vivo*, le miglustat permet une correction totale des flux chlorure et sodique de la muqueuse nasale chez la souris F508del-CFTR (Lubamba *et al.*, 2009).

(3) Les « potentiateurs » du canal CFTR

Les molécules « potentiatrices » ont pour objectif d'augmenter la fonction chlorure du canal CFTR muté présent à la surface de la membrane (Tableau 3). Les mutations de la protéine CFTR qui sont particulièrement propices à cette approche, sont les canaux mutés déjà présents à la membrane mais ayant une activité fonctionnelle diminuée : R117H et G551D.

| | Famille | Mécanisme d'action | clinique | |
|-------------------------------|------------------------------|---|-----------|---|
| Génistéine | Phytoestrogène Isoflavone | Antioxydant Liaison à CFTR Modulation de la probabilité d'ouverture de CFTR | | Illek <i>et al.</i> , 1999 Andersson and Roomans, 2000 Moran and Zegarra-Moran, 2005 |
| VX-770 = Ivacaftor | Cytochrome P450 | Substrat de la protéine CYP3A Augmentation du courant ionique transépithélial | Phase III | Van Goor <i>et al.</i> , 2009 Sloane and Rowe, 2010 Accurso <i>et al.</i> , 2010 Ramsey <i>et al.</i> , 2011 |

Tableau 3 : Les « potentialisateurs » du canal CFTR muté

L'addition d'un correcteur et d'un potentialisateur peut être un traitement plus efficace pour la plupart des patients CF. La protéine F508del-CFTR est délivrée à la membrane apicale via un correcteur mais elle reste cependant peu fonctionnelle : il subsiste une anomalie fonctionnelle induit par la perte du résidu phénylalanine. Ainsi, les patients CF ayant la mutation F508del-CFTR peuvent bénéficier d'un potentialisateur permettant une meilleure fonctionnalité (O'Sullivan and Freedman, 2009). Le 28 juin 2012, les Laboratoires Vertex Pharmaceuticals ont annoncé des premiers résultats encourageants sur la combinaison de VX-809 et VX-770, dans une étude clinique de phase II, chez les patients ayant la mutation F508del-CFTR. Une nouvelle étude est prévue sur une population plus importante de patients CF, ayant la mutation F508del-CFTR,

(4) Les activateurs des voies alternatives de sécrétion

Le but de cette stratégie thérapeutique est d'activer des canaux déjà présents dans la membrane apicale, autre que la protéine CFTR.

Plusieurs voies alternatives ont été décrites (tableau 4).

| | Famille | Mécanisme d'action | Clinique | |
|------------------------|--------------------------------------|---|-----------|--|
| P2X | Récepteur purinergique | Augmentation du flux calcique Activation canal Cl ⁻ /Ca ²⁺ -dépendant | | |
| P2Y₂ | Canal purinergique | Canal chlorure alternatif | | Guilbault <i>et al.</i> , 2007 |
| Denufosal | Agoniste de P2X Analogue de l'UTP | Stimulation des transports ioniques Réhydratation du mucus | Phase III | Deterding <i>et al.</i> , 2007 Inspire Pharmaceutic, 2011 |
| MOLI1901 | Antibiotique | Stimulation des canaux chlorures Réhydratation du mucus Activation canal Ca ²⁺ | Phase II | Zeitlin <i>et al.</i> , 2004 Grasemann <i>et al.</i> , 2007 |

Tableau 4 : Les activateurs des voies alternatives de sécrétion

II. La physiologie osseuse

A. Le squelette

1. Généralités

Le tissu osseux est un tissu complexe composé d'une matrice extracellulaire calcifiée dont les propriétés permettent d'assurer 4 fonctions principales (Karaplis *et al.*, 2002) :

- 1- Une fonction mécanique assurant le support du poids de l'organisme (Marie and Kassem, 2011). Le tissu osseux est un des tissus les plus résistants, capable de supporter des contraintes mécaniques,
- 2- Une fonction de protection des organes essentiels,
- 3- Une fonction métabolique liée à sa capacité de stocker le calcium et le phosphate (Marie and Kassem, 2011). Le tissu osseux est un tissu dynamique. Il est en constant remodelage sous l'effet des pressions mécaniques. Cela entraîne la libération des molécules prisonnières lors

de la résorption osseuse et un stockage de ces molécules lors de la formation osseuse. Il en est de même pour les minéraux tels que le calcium et le phosphate,

- 4- Une fonction hématopoïétique : l'os renferme dans leurs espaces médullaires, la moelle hématopoïétique : les cellules souches se trouvent au voisinage des cellules osseuses. Ces cellules peuvent se différencier en plusieurs lignées différentes et notamment en fibroblastes, ostéoblastes, adipocytes...

2. La structure squelettique

Il existe 3 variétés anatomiques de l'os : les os longs (comme le tibia, le fémur), les os courts (comme les os du carpe, les vertèbres) et les os plats (comme le sternum, les côtes). Au niveau des surfaces articulaires, on trouve les cartilages articulaires, les os longs, les os courts ou plats. Ils sont entourés par le périoste. Ce dernier est constitué d'une couche externe de tissu conjonctif fibreux et d'une couche interne contenant les cellules ostéoprogénitrices. La cavité centrale des os longs est bordée par l'endoste, constitué d'une fine couche de tissu conjonctif contenant des cellules ostéoprogénitrices et des cellules bordantes. Ces 3 types d'os ont la même composition (collagène et cristaux), mais pas la même structure. Dans un os long, le cartilage est en connexion direct avec l'os trabéculaire. A ce niveau-là, il y a probablement de nombreux échanges entre l'os et le cartilage. Cet os est composé d'une partie diaphysaire avec au centre la partie médullaire. C'est là que se font les échanges hématopoïétiques/os.

Compact Bone & Spongy (Cancellous Bone)

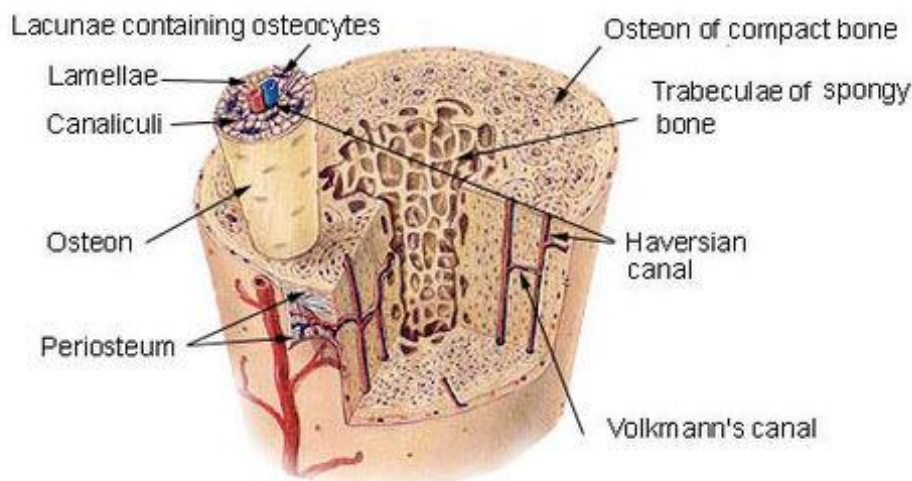


Figure 9 : L'os cortical et l'os spongieux (www.wikipedia.com)

Le tissu osseux se présente sous deux aspects bien distincts : l'os cortical compact qui forme la partie externe de l'os et l'os spongieux ou trabéculaire, partie interne de l'os (figure 9).

L'os cortical est un os très compact. Il constitue 80 à 90% du tissu osseux. Il est essentiellement situé dans les os longs, est constitué d'ostéons (appelé aussi système de Havers). Ces ostéons sont

constitués par des lames osseuses concentriques disposées autour d'un canal haversien et sont reliés entre eux ou à la surface de l'os et à la moelle osseuse par des canaux transversaux ou obliques. Entre les lamelles, se situent les ostéoplastes contenant le corps cellulaire des ostéocytes. Le canal de Havers contient des capillaires sanguins, qui apportent des nutriments à tout l'ostéon, et des filets nerveux amyéliniques enrobés d'un peu de tissu conjonctif lâche. Les canaux de Havers sont reliés entre eux (figure 9) (Rho *et al.*, 1998 ; Weiner and Wagner, 1998 ; Vanshith, 2007).

L'os spongieux ou trabéculaire est constitué d'ostéons qui prennent un aspect de croissant. Les lamelles sont arrangées en trabécules. Elles sont plates et forment une structure tubulaire. La densité de l'os spongieux varie (Vashishth, 2007). Il représente environ 15% de l'os total et constitue 80% de la surface d'échange hématopoïétique entre l'os et la moelle osseuse. Ce tissu médullaire hématopoïétique se situe entre les travées osseuses. Il est présent au niveau des vertèbres (c'est le lieu où le remodelage est le plus élevé), des os plats (côtes, sternum, bassin, crâne) et l'extrémité des os longs.

B. L'histologie du tissu osseux

Comme tous les tissus, l'os est constitué de cellules et d'une matrice extracellulaire qui a la particularité d'être minéralisée. Pour assurer son renouvellement, la minéralisation du tissu impose une phase de résorption et ensuite une phase de formation. Les cellules bordantes, les ostéoblastes et les ostéocytes sont des cellules ostéoformatrices. Les ostéoclastes sont ostéorésorbants. Les ostéoblastes, les ostéoclastes et les cellules bordantes de l'os se trouvent à la surface des plages de tissu osseux, alors que les ostéocytes se situent à l'intérieur de la matrice osseuse.

1. Les cellules osseuses

a) Les ostéoblastes

Les ostéoblastes forment l'os et élaborent les constituants organiques de la matrice extracellulaire : leur cytoplasme est abondant et riche en organites impliqués dans la synthèse protéique (réticulum endoplasmique granulaire abondant, appareil de golgi volumineux) (Marie, 2001 ; Karsenty, 2008). Parmi ces protéines, les plus représentées sont le collagène de type I, la sialoprotéine osseuse, l'ostéocalcine, l'ostéopontine, le récepteur à l'hormone parathyroïdienne (PTHrP), les BMPs (Bone Morphogenetic Protein) (Raggatt and Partridge, 2010). Ces cellules sécrètent aussi de nombreux facteurs de croissance à vocation paracrine et/ou autocrine. Elles synthétisent des molécules d'adhésion qui interagissent avec les intégrines, les protéoglycanes.

Le stade de différenciation influence la contribution au remodelage osseux : les cellules ne sécrètent pas les mêmes facteurs de croissance en fonction de leur niveau de différenciation (Raggatt and Partridge, 2010). Les ostéoblastes matures sont souvent retrouvés en groupe, alignés sur la matrice osseuse (Manolagas and Jilka, 1995). De forme cubique, ils sont reliés entre eux et avec les ostéocytes par des jonctions communicantes.

Les ostéoblastes ont pour origine des cellules hématopoïétiques mésenchymateuses pluripotentes présentes chez l'adulte essentiellement dans le stroma médullaire. L'origine précise, *in vivo*, de ces cellules n'est pas bien connue, mais des travaux récents suggèrent une localisation dans les espaces péri-vasculaires (Sacchetti *et al.*, 2007).

La différenciation des préostéoblastes correspond à un processus complexe qui met en jeu des interactions multiples entre les cellules et la matrice (Komori, 2006 ; Marie, 2008 ; Raggatt and Partridge, 2010).

Après une étape de prolifération initiale de cellules précurseurs, l'ostéoblaste acquiert progressivement les caractéristiques d'une cellule fonctionnelle différenciée. Les signaux, qui régulent cette différenciation, ne sont pas encore complètement bien élucidés. Il y aurait comme des « interrupteurs moléculaires » permettant le choix de la voie de différenciation de la cellule mésenchymateuse (figure 10) : la voie chondrocytaire est sous le contrôle de Sox5, Sox6 et Sox9 (De Crombrughe *et al.*, 2001) ; la différenciation en myocytes est liée aux facteurs MRF (Myogenic Regulator Factor) et MEF (Myogenic Enhance Factor). Les adipocytes se différencient grâce à PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma ; Gimble *et al.*, 2006). La différenciation de l'ostéoblaste nécessite l'activation « d'interrupteurs moléculaires » successifs. Le précurseur acquiert sa différenciation ostéoblastique sous l'action de Runx2 (Runt-related transcription factor) (Franceschi *et al.*, 2003 ; Marie, 2008). La cellule devient un préostéoblaste capable de synthétiser du collagène de type I après l'activation du gène osterix (Marie, 2008). La différenciation finale est acquise lors de l'activation des gènes Dlx-5, Msx-2, Twist et ATF4.

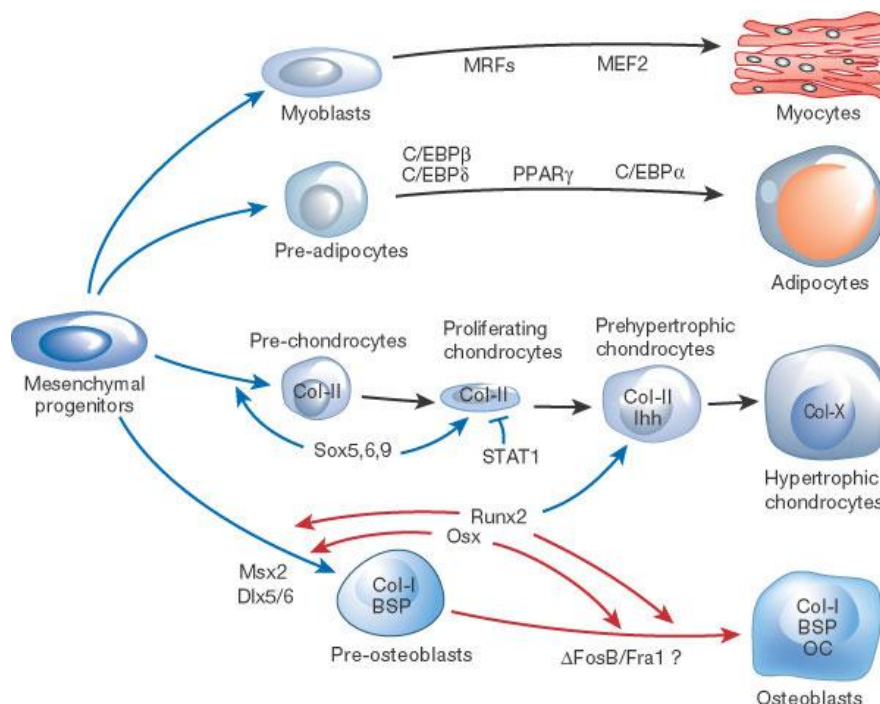


Figure 10 : Différenciation des ostéoblastes (Harada and Rodan, 2003)

Une fois leur travail réalisé, les ostéoblastes ont 3 voies de recyclage : ils se transforment en ostéocytes en étant piégés dans la matrice extracellulaire, ils sont mis au repos et deviennent des cellules bordantes ou elles meurent par apoptose.

b) Les ostéocytes

L'ostéocyte est un ostéoblaste différencié qui est "piégé" dans la matrice osseuse (devenir de 10% des ostéoblastes), dans la cavité osseuse fluide appelée aussi une lacune (Bonewald, 2007 ; Marie, 2009). L'ostéocyte est incapable de se diviser, entièrement entouré par la matrice extracellulaire osseuse minéralisée. Leur corps cellulaire est fusiforme, de plus petite taille et possédant moins d'organites que celui de l'ostéoblaste. La taille de ces cellules varie en fonction de l'espèce étudiée. Ces cellules sont en nombre très important : elles représentent 90 % de la population cellulaire osseuse et peuvent vivre jusqu'à 50 ans (Marotti *et al.*, 1990 ; Raggatt and Partridge, 2010).

Des ostéoblastes produisent de la matrice extracellulaire, puis la minéralisent. Certains ostéoblastes vont être emprisonnés dans cette matrice minéralisée et prennent le nom d'ostéocytes (figure 11).

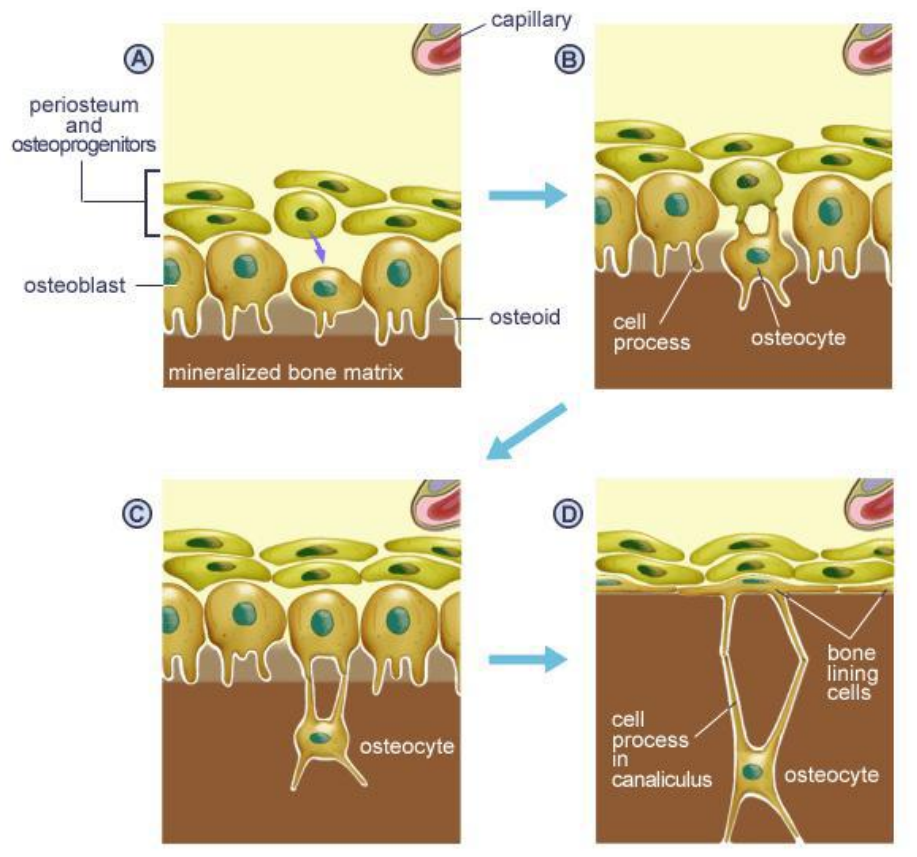


Figure 11 : De l'ostéoblaste à l'ostéocyte (MacKee, 2012)

Les ostéocytes produisent et sécrètent des molécules de la matrice organique. Ces cellules siègent dans des logettes (ostéoplastes ou lacunes) d'où partent de minuscules canalicules anastomosés contenant leurs prolongements cytoplasmiques, fins, nombreux, plus ou moins longs, reliés entre eux par des jonctions communicantes (figure 11) (Skerry, 2008 ; Bonewald, 2011). Ces prolongements cytoplasmiques forment un réseau et permettent des connexions entre ostéocytes et avec d'autres types cellulaires (comme des ostéoblastes) suggérant une collaboration intense, un dialogue important entre cellules (synchronisation des cellules, communication avec d'autres couches lamellaires et des ostéoblastes ; Kamioka *et al.*, 2001).

Les ostéocytes, avec des capacités de synthèse et de résorption limitées, participent au maintien de la matrice osseuse et contribuent à l'homéostasie de la calcémie.

Ces cellules assurent aussi une fonction de senseur de l'homéostasie osseuse (Cullinane, 2002). Elles agissent comme des mécanorécepteurs (Marie, 2008) : ces cellules sont sensibles aux variations de pression qui s'exercent sur le squelette, par l'intermédiaire de la matrice et via des flux liquidiens contenus dans les canalicules. Les ostéocytes émettraient en continu des informations depuis la profondeur jusqu'à la surface lorsqu'ils sont régulièrement stimulés par des contraintes mécaniques (Robling *et al.*, 2008). La cessation de ces stimulations induit la mort des ostéocytes par nécrose ou par apoptose (Noble, 2005 ; Aguirre *et al.*, 2006). C'est un signal pour l'activation d'ostéoclastes afin de commencer la résorption osseuse de cette zone (Burger and Klein-Nulend, 1999 ; Bonewald, 2011). Lors de micro-dommages de l'os, les ostéocytes les détectent, initialisent et directement induisent le remodelage osseux afin de « réparer » l'os (Manalagas, 2000 ; Verborgt *et al.*, 2002 ; Noble, 2008). Les ostéocytes contrôlent la formation et la résorption osseuse (Skerry, 2008 ; Marie, 2009). Ces cellules sont capables de modifier l'environnement de la matrice osseuse : elles produisent des hormones modifiant la minéralisation et des métalloprotéases induisant la dégradation de la matrice (Inoue *et al.*, 2006). Elles inhibent la formation osseuse en synthétisant de la sclerotine. Ces cellules peuvent induire le recrutement et la fonction des ostéoclastes par la production de TGF- β (Marie, 2012) dépendant des œstrogènes, eNOS, NO, RANK, MCSF (Noble, 2008 ; Marie, 2009 ; Marie, 2012).

c) Les cellules bordantes

Les cellules bordantes (lining cells) sont des ostéoblastes au repos. Ce sont des petites cellules aplaties, allongées et peu différenciées. Elles possèdent peu d'organites. Elles communiquent entre elles et avec les ostéocytes voisins par des jonctions gap communicantes. Elles restent séparées de la surface minéralisée par une fine couche de collagène non minéralisé d'environ 1 μm .

Sous l'influence de différents activateurs, elles s'activent, élaborent des métalloprotéases. Ces dernières mettent à nu la surface minéralisée de l'os afin d'ouvrir le passage pour les ostéoclastes.

d) Les ostéoclastes

Les ostéoclastes sont les seules cellules de l'organisme capable de résorber les tissus minéralisés (Raggatt and Partridge, 2010). Ce sont des cellules d'origine hématopoïétique, post-mitotiques, multinucléées possédant de quelques noyaux à une cinquantaine de noyaux (Teitelbaum and Ross, 2003). Les ostéoclastes sont des membres de la famille des phagocytes monocytaires / macrophagiques.

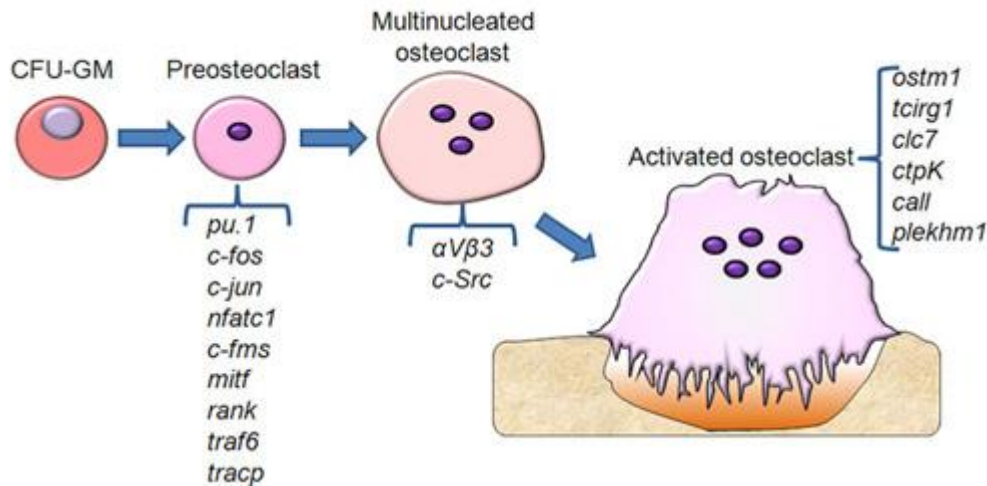


Figure 12 : La différenciation ostéoclastique (d'après Del Fattore *et al.*, 2012)

Les cellules hématopoïétiques se différencient en pro-monocytes pour donner naissance à 3 types cellulaires possibles : les cellules dendritiques ; les monocytes (puis macrophages par fusion des monocytes) et les pré-ostéoclastes. Les pré-ostéoclastes fusionnent pour former des ostéoclastes (figure 12) (Marie and Kassem, 2011).

La calcitonine est une hormone sécrétée par les cellules de la thyroïde. C'est une des rares hormones qui agit directement sur l'ostéoclaste et le régule en inhibant sa fonction et en accélérant son apoptose (Teitelbaum and Ross, 2003).

2. La matrice organique

Outre les cellules osseuses, le tissu osseux est constitué de deux phases : une phase organique qui représente 20 à 40 % de la matrice totale et une phase minérale de 50 à 70 %. Il contient également 5 à 10 % d'eau et moins 3 % de lipides.

La matrice extracellulaire est présente à tous les niveaux de l'organisme mais son abondance et sa composition varient selon les tissus. Elle joue des rôles physiologiques très importants : l'architecture, le soutien mécanique, le stockage moléculaire, le support de migration cellulaire.

a) Le collagène

Dans le tissu osseux, la matrice organique est principalement composée de microfibrilles de collagène I : 90 % de la phase organique. Les collagènes constituent une superfamille de molécules formées par des protéines classiques et des protéines portant des domaines de type collagénique. Chaque molécule de tropocollagène est composée d'une tripe hélice alpha (Traub and Piez, 1971). Dans un trimère, les chaînes alpha peuvent être identiques ou non. Les fibres de collagène sont formées, dans l'espace extracellulaire, par l'assemblage de molécules de tropocollagènes synthétisées et excrétées essentiellement par les fibroblastes. Il existe plusieurs sous-groupes mais le plus important est celui du collagène de type I. Ces fibrilles se regroupent pour former des fibres qui s'assemblent en faisceaux (Nyman et al., 2005). Ces derniers permettent le soutien du tissu osseux.

b) Les protéines non collagéniques

La matrice organique est aussi composée de nombreuses protéines non collagéniques dont les polysaccharides : les glycosaminoglycanes et protéoglycanes. Ces derniers sont formés par un noyau protéique sur lequel se lient des glycosaminoglycanes (longues chaînes polysaccharidiques non ramifiées faites de la répétition d'un même motif disaccharidique). Les plus répandus sont la décorine (chondroïtine-sulfate/dermatane-sulfate) présente surtout dans les tissus conjonctifs, le perlecan (héparane-sulfate) présent dans les membranes basales, et l'aggrécane abondant dans le cartilage. Des agrégats de protéoglycanes correspondent à une molécule d'acide hyaluronique sur laquelle se lient de multiples protéoglycanes. Leur charge négative élevée leur permet de retenir de grandes quantités d'eau. Ces molécules ont aussi la capacité de fixer certaines cytokines ou facteurs de croissance, et ainsi de moduler leur biodisponibilité.

Sont présentes aussi de nombreuses glycoprotéines telles que la phosphatase alcaline, l'ostéonectine, la tétranectine, les thrombospondines, la fibronectine, la vitronectine, les fibrillines, l'ostéopontine, les sialoprotéines (BSP et BSP-II), la protéine matricielle dentaire (DMP-1) (Tableau 5).

| | Origine | Action | |
|--------------------------------------|---|--|---|
| Alcaline phosphatase | pré-ostéoblastes Ostéoblastes | Hydrolyse des esters monophosphates Croissance des cristaux d'hydroxyapatite | Wuthier and Register, 1984 Owen et al., 1990 |
| Ostéonectine | Ostéoblastes | Nucléation des cristaux d'hydroxyapatite Régulation de la différenciation OB Régulation de l'activité OB Régulation des activités enzymatiques Fixation des facteurs de croissance | Termine et al., 1981 Yan et al., 1999 |
| Tétranectine | | Régulation de la minéralisation | Nielson et al., 1997 |
| Thrombospondine | Plusieurs lignées Différents stades de différenciation | Régulation de la différenciation Régulation de la survie cellulaire Régulation de la migration et prolifération Régulation de la résorption osseuse | Carron et al., 1995 Adolph et al., 1999 Newton et al., 1999 Hankenson et al., 2000 |
| Fibronectine | Cellules mesenchymateuses | Régulation de la différenciation OB | Gehron and Robey, 2002 |
| Vitronectine | | Attachement cellulaire | Grzesik et al., 1994 |
| Ostéopontine | Ostéoblastes | Attachement cellulaire Formation de la matrice | Sodek et al., 2000 |
| Sialoprotéine osseuse | Ostéoblastes Ostéoclastes Chondrocytes | Nucléation des cristaux d'hydroxyapatite | Bianco et al., 1991 Hunter and Goldberg, 1993 Masi et al., 1995 Robey et al., 2002 |
| Protéine matricielle dentaire | Ostéoblastes | Régulation de la différenciation cellulaire OB Minéralisation | De Souza et al., 1997 Ravindran et al., 2008 |
| Ostéocalcine | Ostéoblastes | Minéralisation | Owen et al., 1990 Hunter et al., 1996 |

Tableau 5 : les glycoprotéines présentes dans la matrice osseuse

c) Les cytokines et les facteurs de croissance

La matrice organique contient aussi des cytokines et des facteurs de croissance sécrétés par les cellules osseuses et jouant un rôle fondamental dans la régulation du remodelage du tissu osseux et de la minéralisation de la matrice extracellulaire osseuse. Ces protéines sont piégées dans la matrice et ne deviennent actives qu'à leur libération lors de la résorption osseuse.

Les cytokines constituent un ensemble hétérogène de médiateurs protéiques dont certains sont appelés interleukines, lymphokines, facteurs de croissance...Elles sont produites par de nombreux types cellulaires en réponse à un signal activateur. Elles agissent sur leurs cellules cibles en se fixant sur des récepteurs spécifiques, exprimés en général en très faible densité sur différents types cellulaires, expliquant les multiples activités biologiques des cytokines. Selon la localisation de la cellule cible par rapport à la cellule sécrétrice, les cytokines peuvent avoir une action autocrine, paracrine ou endocrine. Les récepteurs membranaires aux cytokines sont classés en plusieurs groupes. Ils induisent des signaux spécifiques à chaque cytokine et des signaux communs aux différents stimuli. Il existe des cytokines inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, TNF), des chémokines, des cytokines anti-virales (interférons), la superfamille des TGF- β (avec les BMP) et les facteurs de croissance (IL-3, M-CSF, IGF, ...).

Les principaux facteurs de croissance identifiés dans la matrice osseuse sont le FGF (Fibroblast Growth Factor), les IGF (Insulin-like Growth Factors I et II), le TGF (Transforming Growth Factor) et les BMPs (Bone Mineral Protein).

Les *FGF basiques ou acides*, sont produits par les ostéoblastes. Ce sont des régulateurs importants dans le recrutement, la différenciation et la fonction de l'ostéoblaste (Marie, 2003). Ils vont favoriser l'expression de plusieurs cytokines par les ostéoblastes. Ils augmentent, notamment, l'expression de l'ostéocalcine et l'ostéopontine. Il a été démontré, *in vitro*, une inhibition de la synthèse de collagène et l'activité des phosphatases alcalines, mais les ostéoblastes sont capables, *in vivo*, de stimuler la synthèse de l'endoste.

Par le biais d'une action sur la transcription, les *IGF-I et -II* stimulent la prolifération des ostéoblastes. Les IGF1 jouent un rôle physiologique dans l'acquisition et le maintien de la masse osseuse (Rosen and Bilezikian, 2001 ; Giustina *et al.*, 2008). *In vivo*, ils activent la prolifération des ostéoblastes et la formation osseuse. Ils augmentent, *in vitro*, la synthèse de collagène par les ostéoblastes. Les effets des IGF sur les ostéoblastes dépendent de la présence de protéines particulières : les Binding proteins ou BPs (Schmid *et al.*, 1992). La BP3 module l'activité biologique des IGFs en stabilisant ou en bloquant la liaison des IGF à leur récepteur. Chez l'homme, les IGF-II sont majoritairement exprimés par rapport aux IGF-I. De plus, la liaison entre l'IGF et le BP5 est la plus courante et possède une forte affinité pour le calcium. Par ailleurs, l'IGF-I semble jouer un rôle important dans la réparation osseuse : une augmentation de la quantité d'IGF-I est observée dans l'os néoformé après une fracture. Les modèles murins indiquent que l'IGF1 endogène augmente la formation et la masse osseuses (Zhao *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2002). Donc une diminution du taux sérique d'IGF1 induit une diminution de la croissance du sub-périoste et de la longueur osseuse (Yakar *et al.*, 2009). *In vivo*, le traitement avec de l'IGF1 stimule la formation osseuse (Fowlkes *et al.*, 2006) et prévient la perte osseuse chez la souris ostéoporotique (Machwate *et al.*, 1994 ; Mueller *et al.*, 1994 ; Conover *et al.*, 2002).

Les ostéoblastes produisent du *TGF β* et possèdent des récepteurs à ces facteurs. Le *TGF β* est un facteur local fondamental dans le contrôle de l'ostéogénèse. Il a un effet anabolique sur le tissu osseux : une augmentation de la production de la matrice extracellulaire, une augmentation de l'adhérence, une augmentation de la prolifération et de la différenciation des ostéoblastes, une inhibition de la dégradation de la matrice et de l'apoptose des ostéoblastes (Janssens *et al.*, 2005). Il induit donc un contrôle local de la formation et du remodelage osseux. En effet, dans de nombreux modèles *in vitro*, il a un effet négatif sur la résorption osseuse. Il est aussi impliqué dans l'ostéogénèse réparatrice : son expression est augmentée lors de la réparation de fractures osseuse (Centrella *et al.*, 1991). Enfin, ce facteur contrôle la différenciation ostéoclastique en augmentant la production d'OPG par les cellules stromales et les ostéoblastes.

Les *BMPs* ou Bone Mineral Proteins constituent un ensemble de protéines présentes dans la matrice osseuse. Elles forment une famille de 6 protéines et présentent une forte homologie avec les *TGF β* . Elles sont produites par les ostéoblastes et jouent un rôle fondamental dans le contrôle de la formation osseuse (Canalis *et al.*, 2003), notamment dans le développement embryonnaire, la cicatrisation après une fracture. *In vivo*, elles sont ostéoinductives. *In vitro*, certaines stimulent la prolifération ostéoblastique. Elles agissent en augmentant l'expression de *Cbfa1/Runx2* dans les précurseurs ostéoblastiques. Elles stimulent l'expression de gènes dans les ostéoblastes tels que la phosphatase alcaline, le collagène de type I, l'ostéocalcine. Dans l'os, l'une des plus importante est le

BMP2 : elle active Cbfa1. Les BMP2 et 3 semblent être de puissants agents stimulant la différenciation ostéoblastique. *In vivo*, on observe un effet combiné de toutes ces BMPs.

d) Les protéinases osseuses

Les différents composants de la matrice extracellulaire sont dégradés par différentes protéinases : les métalloprotéinases (MMP), les protéases et le système plasmine / activateur du plasminogène (PA) (Lalou *et al.*, 1994 ; Murray, 2001 ; Chakraborti *et al.*, 2003). Ceci permet le renouvellement de cette matrice et est déterminant dans la croissance, le développement ou la réparation tissulaire. Elle intervient aussi dans des processus pathologiques tels que l'inflammation par exemple.

3. La partie minérale

La phase minérale est constituée de cristaux d'hydroxyapatite (phosphate de calcium cristallisé) (Glimcher, 1987 ; Traub *et al.*, 1989 ; Landis *et al.*, 1996) et de carbonate de calcium. Ces cristaux sont visibles entre les fibres de collagène et/ou à l'intérieur de celles-ci, sous la forme de petites aiguilles hexagonales, denses aux électrons. Les ions Ca^{2+} et PO_4^{3-} situés en surface des cristaux participent à des échanges rapides avec le liquide interstitiel et donc avec le courant sanguin. L'os, qui contient 98 % du calcium de l'organisme, représente un réservoir de calcium, de phosphore, de carbonate, de sodium et de magnésium. Le calcium extracellulaire joue un rôle très important dans le contrôle du remodelage osseux. Ceci se fait par l'activation du récepteur CaSR (Seven transmembrane-spanning extracellular calcium-sensing receptor). Ce récepteur est sensible à l'augmentation du calcium extracellulaire dans la glande parathyroïdienne et diminue la sécrétion de PTH, hormone modulant l'activité ostéoblastique (Marie, 2009). Ainsi, l'os joue un rôle primordial dans le métabolisme phosphocalcique. Alors que le collagène I assure à l'os ses propriétés d'élasticité et de flexibilité, la phase minérale assure sa résistance. Ce sont les ostéoblastes qui régulent la minéralisation de la matrice même si le mécanisme reste encore mal compris (Murshed *et al.*, 2005). Après l'initiation de la cristallisation qui correspond à la nucléation au niveau du collagène, il y a une croissance des cristaux soit par addition d'ions supplémentaires soit par agrégation de nouveaux cristaux. Cette croissance des cristaux est contrôlée par le collagène lui-même et par des protéines non collagéniques qui régulent sa taille et sa forme.

4. L'eau

L'eau occupe environ 25 % du volume osseux. Elle est uniformément distribuée au sein du tissu osseux. Elle est présente sous de nombreuses formes : libre dans les espaces lacunaires et vasculaires ou liée aux phases organiques ou minérales. En effet, l'eau est par nature une molécule polarisée qui a la capacité intrinsèque de se lier aussi bien aux corps minéraux (PO_4^- , Ca^{2+} , ...) qu'aux corps organiques et plus particulièrement au niveau des groupements polaires (hydroxyproline, hydroxylysine du collagène, ...).

C. Le modelage et le remodelage

1. Le modelage

La mise en place du tissu osseux :

La mise en place du tissu osseux est différente en fonction des types d'os. Les os plats (vertèbres et crâne) se forment par ossification intra-membranaire qui est un processus direct dans lequel les cellules mésenchymateuses se différencient en pré-ostéoblastes capables de former une matrice osseuse qui se minéralise. L'ossification endochondrale concerne les os longs (tibia et fémur) et nécessite une ébauche cartilagineuse qui est progressivement remplacée par l'os.

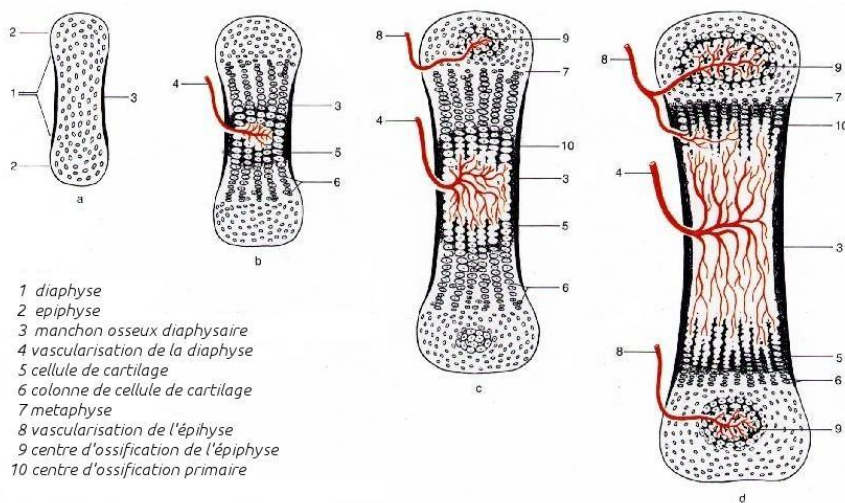


Figure 13 : L'ossification endochondrale

Tout d'abord, les chondrocytes prolifèrent et le cartilage se minéralise (figure 13). Il y a alors une invasion vasculaire qui permet l'arrivée des ostéoblastes et des ostéoclastes dans ce qui deviendra la cavité médullaire. Les ostéoclastes résorbent le cartilage calcifié pendant que les ostéoblastes synthétisent du collagène de type I qui sera par la suite minéralisé. A la fin de ce processus, au niveau des os longs, la chondrogenèse s'établit entre l'épiphyse et la diaphyse et forme la plaque de croissance. Cette dernière va servir de source continue de cartilage remplacé par du tissu osseux, assurant ainsi la croissance en longueur de l'os. La plaque de croissance est alors entourée de tissu osseux avant d'être, elle aussi, remplacée par de l'os après la puberté stoppant ainsi la croissance. Chez la souris, cette plaque ne se referme pas, bien que son activité soit très fortement diminuée à l'âge adulte (Seeman, 2003).

Evolution du capital osseux :

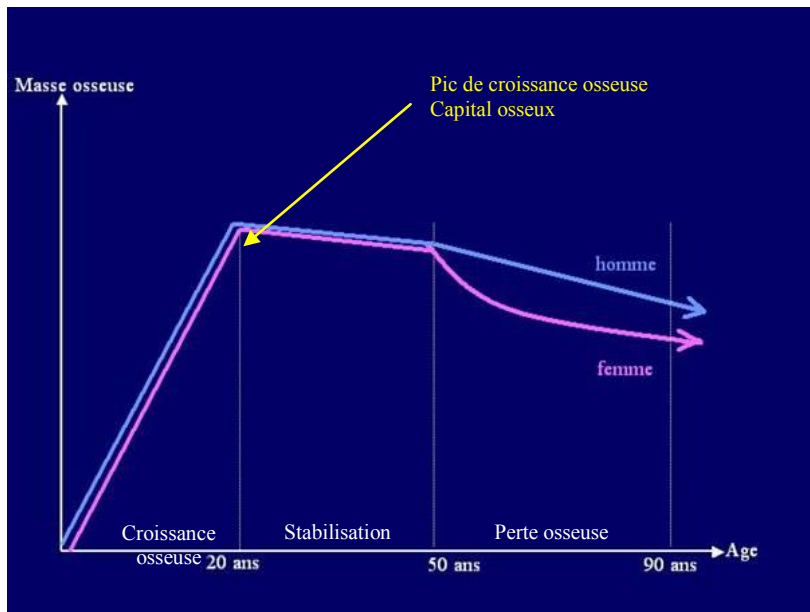


Figure 14 : Evolution du capital osseux au cours du temps
(d'après la Société Française de Rhumatologie, 2005, sfr.larhumatologie.fr)

De la naissance jusqu'aux alentours de 25 ans, l'Homme construit son capital osseux. La masse osseuse augmente progressivement : la formation osseuse va excéder la résorption osseuse. Ainsi la balance osseuse est positive. Au moment de la puberté, il y a une accélération importante de la formation osseuse. A l'âge adulte, on atteint une phase de relative stabilité : la formation osseuse = la résorption osseuse. C'est le remodelage osseux. Ce capital osseux diminue lentement, dès 50 ans, chez la femme comme chez l'homme. Chez la femme ménopausée, il y a une levée du frein de la résorption osseuse induit par le manque d'œstrogènes. C'est un bilan négatif avec une perte osseuse plus ou moins importante (Seeman, 2002 ; Khosla et al., 2006 ; Khosla, 2008 ; Marie and Kassem, 2011).

2. Le remodelage osseux

Une fois le squelette mis en place à la fin de la croissance osseuse, l'os ne reste pas inerte. Il est en constant renouvellement (10 % par an ; Martin et al., 2008) que ce soit dans l'os compact ou trabéculaire : c'est le remodelage. Bien que l'os cortical représente 80% du squelette, son renouvellement correspond à 20% du remodelage du tissu osseux alors que l'os trabéculaire forme 15% du squelette mais 80% du remodelage se fait au niveau des travées osseuses (Parfitt et al., 1987). Ce phénomène permanent s'effectue grâce à des unités fonctionnelles de remodelage dans lesquelles les activités métaboliques des ostéoclastes et des ostéoblastes sont étroitement couplées dans l'espace et dans le temps (Mandagas et al., 2000 ; Hauge et al., 2001 ; Andersen et al., 2009 ; Proff and Romer, 2009 ; Marie, 2012) : les ostéoclastes sont à l'avant pour résorber puis les ostéoblastes sont à l'arrière pour former l'os (figure 15). La durée de ce cycle de remodelage dure

environ 4 mois chez l'adulte : la phase de formation étant plus longue (environ 3 mois chez l'adulte) que celle de la résorption (environ 1 à 2 semaines chez l'adulte) (Parfitt et al., 1994). Les unités de remodelage ne sont pas synchrones ce qui permet d'adapter la quantité et l'architecture de l'os, en fonction de facteurs systémiques (PTH, Vit. D) ou locaux. L'os est ainsi formé de millions d'unités fonctionnelles de remodelage, mobiles et progressant dans le tissu osseux.

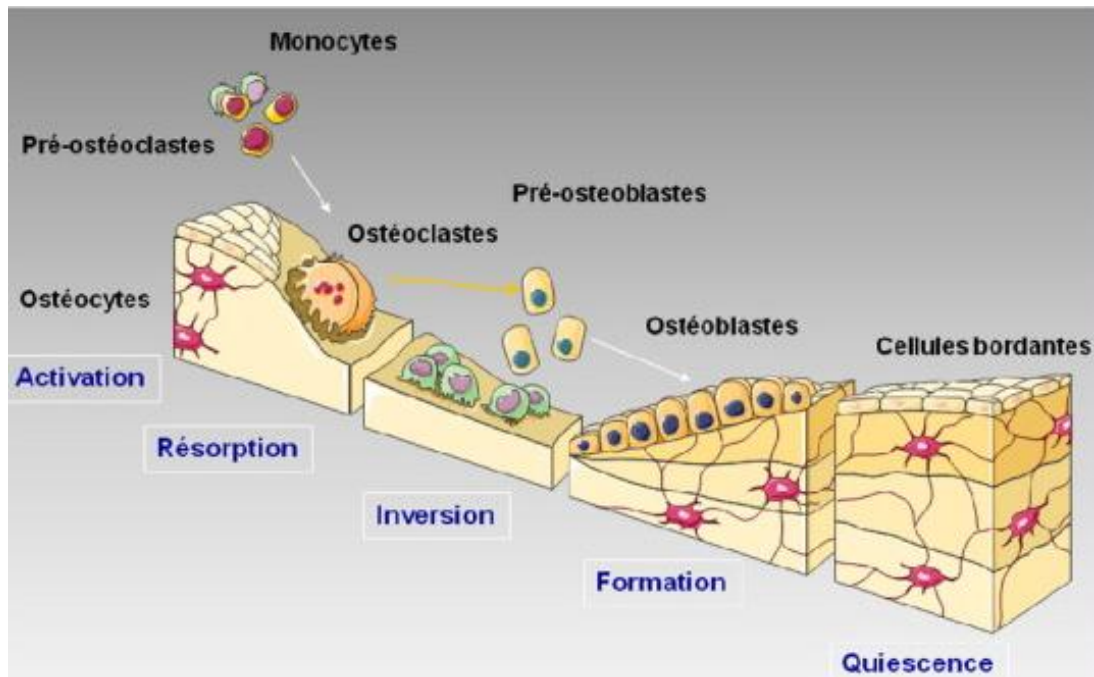


Figure 15 : Le remodelage osseux (Funk-Bretano and Cohen-Solal, 2010)

a) La phase d'activation

La surface osseuse est normalement recouverte de cellules bordantes (figure 15). Sous l'action de facteurs ostéorésorbants (dommages structurels (Verborgt *et al.*, 2002 ; Hazenberg *et al.*, 2006 ; Van Bezooijen *et al.*, 2004, 2005, 2007 ; Robling *et al.*, 2008), immobilisation (Aguirre *et al.*, 2006), hormone parathyroïdienne ou PTH (Juppner *et al.*, 1991), vitamine D3 et prostaglandine E2), les cellules bordantes se rétractent et libèrent l'accès aux ostéoclastes qui peuvent adhérer à la matrice osseuse (Parfitt *et al.*, 1996 ; Raggatt and Partridge, 2010).

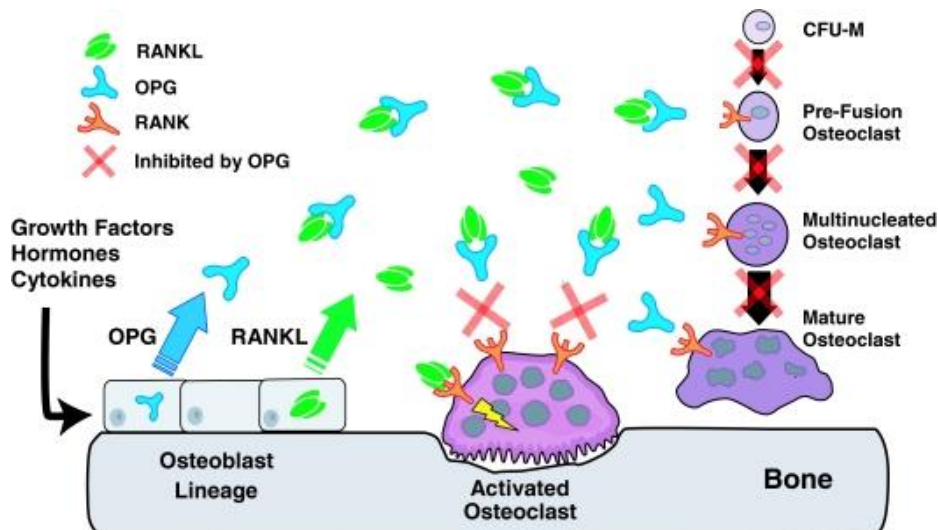


Figure 16 : Mécanisme d'action de RANKL, RANK et OPG (Kearns et al., 2008)

La mise en place du programme de différenciation des précurseurs ostéoclastiques en préostéoclastes puis en ostéoclastes est principalement sous la dépendance de 3 cytokines : M-CSF, OPG et RANK (figure 16) (Proff and Romer, 2009). Les ostéoblastes et les cellules stromales expriment et sécrètent RANKL après leur activation (Lacey *et al.*, 1998 ; Yasuda *et al.*, 1998). La liaison du RANKL sur son récepteur RANK (Anderson *et al.*, 1997 ; Hsu *et al.*, 1999 ; Cremer *et al.*, 2002), exprimé par les ostéoclastes, peut être bloquée par l'ostéoprotégérine ou OPG, un récepteur « leurre » soluble (Simonet *et al.*, 1997 ; Lacey *et al.*, 1998 ; Yasuda *et al.*, 1998). C'est une protéine dont la structure est très proche de celle de RANK, présent à la surface des cellules précurseurs. Elle est capable de se lier à RANKL et entre en compétition avec RANK. Ce mécanisme bloque ainsi l'effet inducteur de RANKL sur RANK sur la différenciation ostéoclastique et l'activation des ostéoclastes matures (Baron et 2001). M-CSF et RANKL existent sous 2 formes : membranaire et soluble (Lum *et al.*, 1999). La solubilité résulte de la protéolyse localisée d'une forme transmembranaire à la surface de la membrane de la cellule stromale, clivage probablement réalisé par des métalloprotéases (Baron, 2001), mais leurs quantités relatives restent actuellement inconnues. C'est le ratio entre OPG et RANKL qui détermine le degré de différenciation des ostéoclastes et leur fonction.

De nombreux autres facteurs agissent sur la différenciation et l'activation des ostéoclastes : des cellules, des cytokines, des hormones, ...

b) La phase de résorption

Les ostéoclastes différenciés vont résorber l'os ancien et former une lacune (figure 15).

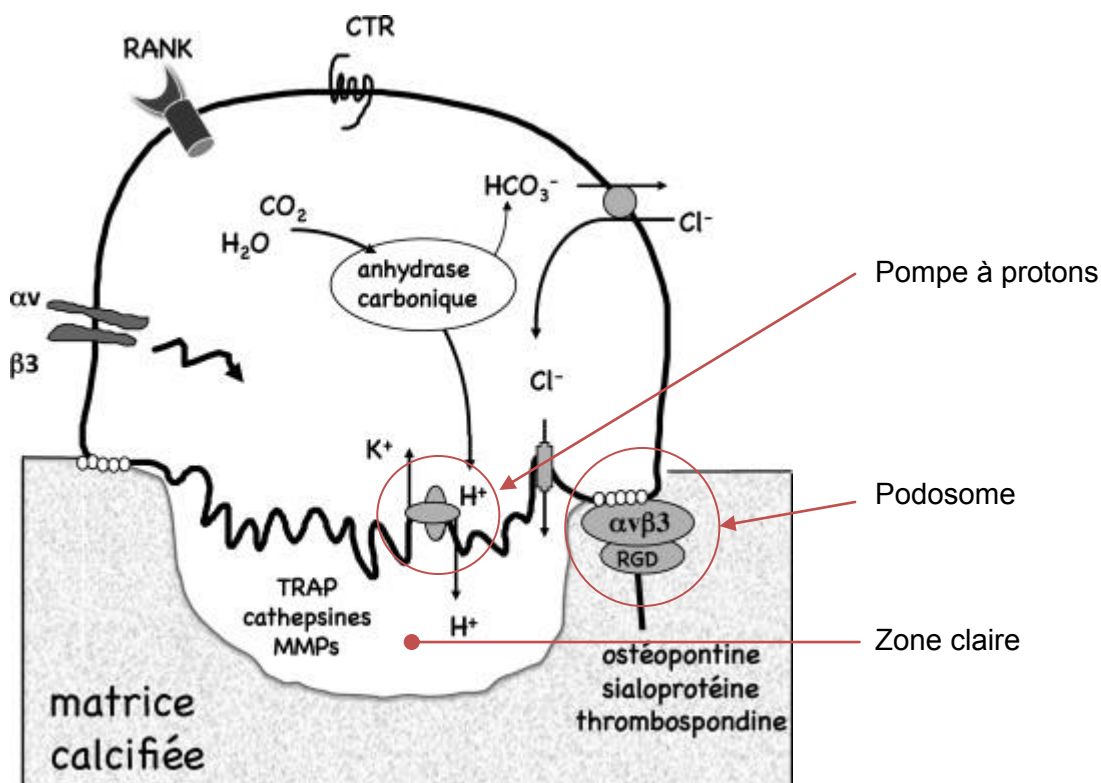


Figure 17 : Action de l'ostéoclaste (d'après Roux, 2010)

Une fois activé, l'ostéoclaste développe son appareil lysosomal et se polarise fortement. Sa membrane plasmique se différencie en deux domaines séparés par un anneau étanche de jonctions cellule-matrice extracellulaire : un domaine apical qui développe une *bordure en brosse* au contact de la surface osseuse et un domaine basolatéral situé à l'opposé (figure 17). L'adhésion de l'ostéoclaste à la surface osseuse au niveau de la zone claire permet la formation d'une zone de scellement. La constitution de cet *anneau périphérique de scellement* permet l'isolement d'une *chambre de digestion étanche* (ou lacune de Howship ou zone de scellement ; Teitelbaum, 2000) entre la membrane de l'ostéoclaste et la surface de la matrice extracellulaire osseuse (Marie, 2008). Cette zone se caractérise par une bande d'actine de 4 μm de hauteur (Saltel *et al.*, 2004). Cet anneau circulaire de scellement est fait d'une multitude de jonctions cellule-matrice extracellulaire ponctuelles ou *podosomes* (figure 17 ; Teitelbaum, 2007). Chaque podosome est fait d'une chaîne de molécules de la matrice extracellulaire (ostéopontine, sialoprotéines osseuses, thrombospondine, vitronectine et collagène I), de molécules transmembranaires (intégrines $\alpha\text{V}-\beta\text{3}$ et $\alpha\text{2}-\beta\text{1}$; McHugh *et al.*, 2000), puis de molécules intracytoplasmiques (taline, vinculine, etc.) liées aux faisceaux de filaments d'actine du cytosquelette de l'ostéoclaste disposés perpendiculairement à la surface cellulaire et entre lesquels se logent des invaginations tubulaires de la membrane plasmique. La région cytoplasmique dans laquelle se situe cet anneau d'actine (dite « zone claire ») est dépourvue d'organites de synthèse. Cette zone claire délimite ainsi l'espace de résorption où le pH est bas (figure 17) (Saffig *et al.*, 1998). Cette acidité du milieu du compartiment sous ostéoclastique est entretenue par des pompes à protons spécifiques de l'ostéoclaste qui expulsent les ions H^+ grâce à l'activité de l'anhydrase carbonique II. Cette acidité favorise la dissolution des cristaux d'hydroxyapatite libérant des minéraux (calcium et

phosphore). L'ostéoclaste déverse, par le biais de la fusion des lysosomes avec la membrane plissée, des enzymes protéolytiques : hydrolases acides et notamment phosphatases acides, cathépsines K (Saftig *et al.*, 1998 ; Delaissé *et al.*, 2000), collagénase, métalloprotéases (Everts *et al.*, 1999 ; Inoue *et al.*, 2006). Cela conduit à la destruction de la matrice organique libérant des produits de dégradation du collagène qui passeront dans la circulation sanguine et dont le dosage dans les urines est un marqueur d'activité ostéoclastique. Une partie des produits de dégradation de la matrice sont internalisés par l'ostéoclaste par des phénomènes d'endocytose pour être ensuite métabolisés ou relargués par la partie basolatérale de la membrane (transcytose). Quand les ostéoclastes ont achevé une lacune ils meurent par apoptose ou ils migrent plus loin pour de nouveau résorber. En effet, les ostéoclastes sont mobiles, capables de se déplacer à la surface des travées osseuses d'un site de résorption à l'autre.

c) La phase d'inversion ou de réversion

Les ostéoclastes sont remplacés par des cellules mononuclées de type macrophagique qui vont lisser le fond de la lacune (Tran Van *et al.*, 1982 ; Everts *et al.*, 2002). La phase d'inversion est induite par le relargage, lors de la résorption, de facteurs de croissance stockés dans la matrice osseuse qui vont stimuler les ostéoblastes. Cette stimulation s'exerce de deux manières : à travers la prolifération des ostéoblastes et à travers l'apposition par ceux-ci de matrice nouvellement formée venant combler la lacune de résorption.

d) La phase de formation osseuse

Elle se comporte en 2 temps, au cours desquels les ostéoblastes jouent un rôle majeur : la production de matrice extracellulaire et la minéralisation de cette matrice.

Elle est caractérisée par le recrutement des ostéoblastes au fond de la lacune. Ce fond est appelé *ligne cimentante* très bien visualisée en lumière polarisée. Les ostéoblastes combleront la lacune en apposant une nouvelle matrice collagénique. Cette matrice non minéralisée est appelée ostéoïde et comble la lacune. 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, stockés dans la matrice osseuse, puis relargués sous forme active lors de la résorption, agissent dans le même sens : FGF2, TGF β , IGF (dont la synthèse est stimulée par l'hormone de croissance GH) (Tang *et al.*, 2009) et les BMP (Bone Morphogenetic Protein) (Raggatt and Partridge, 2010).

L'ostéoïde est secondairement minéralisée ce qui lui confèrera sa solidité. La minéralisation se fait au niveau du front de minéralisation, c'est-à-dire à la jonction entre tissu ostéoïde et tissu minéralisé qui est distant de la surface du tissu ostéoïde de 5 à 30 μm . La phosphatase alcaline est synthétisée par les ostéoblastes (Murshed *et al.*, 2005). Cette enzyme est capable d'hydrolyser les esters phosphoriques qui sont des inhibiteurs de la minéralisation. Les ostéoblastes produisent des vésicules matricielles, réservoirs de phosphatases alcalines et d'ions, qui, déversées dans le milieu

extracellulaire initierait la minéralisation du tissu ostéoïde en favorisant les concentrations locales en ions calcium et phosphates. Il y a deux phénomènes : la minéralisation primaire permet le dépôt d'hydroxyapatite ; la minéralisation secondaire est plus longue et complète la minéralisation primaire (Harmey et al., 2004). C'est l'os nouvellement formé. Enfin les ostéoblastes synthétisent des facteurs de croissance régulant leur propre métabolisme, des facteurs paracrines qui vont influencer le métabolisme des cellules voisines (Interleukine-1, facteurs stimulant la formation ou l'activité des ostéoclastes). Certains de ces facteurs sont inclus dans la matrice ostéoïde et seront ultérieurement libérés quand l'os sera résorbé.

e) Le but du remodelage osseux

L'équilibre entre les processus de résorption et de formation osseuse est régulé par les cellules osseuses, les hormones circulantes, les facteurs de croissance locaux, les molécules de support de la matrice osseuse et les contraintes mécaniques. La vitesse de perte osseuse dépend de la fréquence d'activation : une modification de cette fréquence peut entraîner des modifications transitoires de la masse osseuse. Une accélération du turn-over osseux augmente le nombre d'unités en phase de résorption et se traduit donc par une perte de densité osseuse.

Une matrice osseuse qui n'est pas suffisamment renouvelée peut avoir une mauvaise résistance biomécanique. A l'inverse, un remaniement osseux excessif peut être la cause de fragilisation osseuse, comme par exemple la maladie de Paget.

Le tissu osseux va s'adapter en permanence aux contraintes mécaniques et aux besoins métaboliques. Il doit permettre la constitution d'un squelette adapté à la croissance. Il intervient naturellement pour les besoins en ions de l'organisme par sa mise à disposition du calcium qu'il stocke ou au moment des fractures.

f) Les marqueurs du remodelage osseux

D'importants progrès ont été réalisés ces dernières années dans l'évaluation biochimique du remodelage osseux (Garnero, 1999). Le dosage sérique de l'ostéocalcine mesure l'activité de la formation osseuse. Des dosages urinaires et sanguins des molécules de dégradation du collagène (pyridinoline et déoxy-pyridinoline libres et totales) et surtout de leurs formes associées à des peptides (NTX et CTX) du collagène reflète le niveau de résorption.

Bien que non spécifique des ostéoclastes, certains marqueurs sont couramment utilisés pour les mettre en évidence. C'est le cas de l'expression de la phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP). Cette enzyme est impliquée dans la déphosphorylation des protéines osseuses telles que l'ostéopontine ou la sialoprotéine osseuse (Ek-Rylander *et al.*, 1994) mais aussi dans la génération de radicaux oxygénés dans la lacune de résorption (Halleen *et al.*, 1999). Malgré son implication dans la résorption, la TRAP est exprimée très tôt au cours de la différenciation cellulaire et représente donc un marqueur précoce.

La cathépsine K est également un marqueur précoce de la différenciation ostéoclastique : cette enzyme est essentielle lors de la résorption pour dégrader les fibres de collagène.

Le récepteur à la calcitonine ou CTR est un marqueur tardif de la différenciation ostéoclastique. C'est un peptide sécrété par les cellules C de la glande thyroïde. Il agit en diminuant la résorption osseuse en se fixant sur son récepteur (Boissy *et al.*, 2002).

III. La maladie osseuse dans la mucoviscidose

A. Historique

Depuis la première description de la diminution de la densité minérale osseuse au cours de la mucoviscidose, en 1979, les mécanismes physiopathologiques précis de cette fragilisation osseuse n'ont pas encore été clairement élucidés malgré des publications (Gore *et al.*, 2010 ; Javier and Jacquot, 2011 ; Sermet-Gaudelus *et al.*, 2011). Le terme de « maladie osseuse » a été choisi afin de la différencier de l'ostéoporose post-ménopausique (Aris *et al.*, 2005).

Très tôt, les médecins se sont aperçus d'une augmentation du risque de fractures chez les jeunes adultes CF et en particulier chez les femmes (Aris *et al.*, 1998). Ces fractures sont principalement vertébrales (Shane *et al.*, 1996 ; Aris *et al.*, 1998). Une fracture spontanée du sternum a été observée chez une jeune fille CF de 16 ans avec une insuffisance respiratoire, aboutissant au décès de la patiente (Latzin *et al.*, 2005).

Dans une méta-analyse représentant 1055 patients âgés de 18,5 à 32 ans, des travaux ont clairement montré une prévalence des fractures vertébrales de 14% et une prévalence des autres types de fracture de 19,7% (Paccou *et al.*, 2010). Cette prévalence des fractures vertébrales varie de 5,7 à 31,3% en fonction des méthodes d'analyse utilisées (Grey *et al.*, 1993 ; Elkin *et al.*, 2001 ; King *et al.*, 2005 ; Rovner *et al.*, 2005 ; Stephenson *et al.*, 2006 ; Wolfenden *et al.*, 2008). Ces fractures vertébrales sont majoritairement situées au niveau inférieur du thorax et les fractures de côtes sont particulièrement délétères pour la fonction respiratoire, en diminuant la capacité vitale, en empêchant la toux et l'expectoration et en favorisant les infections pulmonaires (Elkin *et al.*, 2001 ; Aris *et al.*, 2005 ; Stephenson *et al.*, 2006). Ces fractures peuvent être une contre-indication à la transplantation pulmonaire.

Chez l'enfant CF, les données sont contradictoires : une absence ou une augmentation du risque de fracture sans signe de malnutrition et avec une maladie pulmonaire modérée ont été décrites (Grey *et al.*, 1993 ; Henderson and Madsen, 1999 ; Sood *et al.*, 2001 ; Rovner *et al.*, 2005 ; Conway *et al.*, 2008).

A ces analyses de risque de fracture, s'ajoute des études de la densité minérale osseuse. Chez l'adulte, la prévalence d'une ostéoporose densitométrique serait de 9 à 59,1% selon les populations étudiées (Ionescu *et al.*, 2000 ; Stephenson *et al.*, 2006 ; Paccou *et al.*, 2010). Cette fragilité osseuse augmente avec la sévérité de la maladie pulmonaire, l'absorption de corticoïdes et la malnutrition (Grey *et al.*, 1993 ; Frangolias *et al.*, 2003 ; Ujhelyi *et al.*, 2004). Les patients CF adressés pour un bilan pré-greffe ont des densités minérales osseuses basses et les mêmes à 30 ans que

celles des patients d'environ 56 ans ayant une bronchopneumopathie chronique obstructive (Aris *et al.*, 1996 ; Shane *et al.*, 1996). Le même phénotype osseux est observé chez les patients CF ayant un bon état clinique et jamais traités par des corticoïdes (Ujhelyi *et al.*, 2004). Ces derniers résultats indiqueraient une maladie osseuse chez les patients CF sans relation avec les traitements et la sévérité de la maladie pulmonaire.

Chez l'enfant de moins de 6 ans, la densité minérale osseuse est déjà significativement plus basse que celle des enfants témoins appariés. Cette observation est corrélée avec la masse maigre suggérant que l'atteinte osseuse peut être indépendante du statut nutritionnel ou de la sévérité de la maladie (Sermet-Gaudelus *et al.*, 2007). La même chose est observée chez les enfant CF d'environ 12,6 ans (Grey *et al.*, 2008). En longitudinal, le gain de densité minérale osseuse à 2 ans dépend principalement de la fonction respiratoire, puis de la puberté avec des gains qui permettent d'expliquer l'altération progressive de la densité minérale osseuse à partir de l'adolescence du fait d'une mauvaise acquisition du pic de masse osseuse (Buntain *et al.*, 2004 ; Bianchi *et al.*, 2006).

Plusieurs études transversales ont mesuré le niveau de remodelage osseux au cours de la mucoviscidose. Elles montrent principalement une augmentation variable des marqueurs de résorption osseuse mais avec des données contradictoires : hétérogénéité des âges, différents stades de sévérité de la maladie, une corticothérapie ou non, sous infection ou non, des prélèvements non à jeun (Aris *et al.*, 1999 ; Aris *et al.*, 2002 ; Greer *et al.*, 2003 ; Shead *et al.*, 2010). D'autres études ont montré une nette augmentation de la résorption osseuse lors d'épisodes infectieux avec une diminution de ces marqueurs lors d'une antibiothérapie (Bell *et al.*, 2000 ; Conway, 2001 ; Shead *et al.*, 2010) mais aussi sans infection, à tout âge chez les patients CF (Greer *et al.*, 2003). Le taux d'ostéocalcine n'est diminué que chez les adultes CF et le rapport ostéocalcine/déoxyypyridinoline mesurant le couplage formation/résorption n'est normal que chez les enfants. Ceci suggère une altération de la formation osseuse et du couplage formation/résorption osseuse dès l'enfance et persistante chez l'adulte CF (Greer *et al.*, 2003 ; Grey *et al.*, 2008).

Deux études histomorphométriques réalisées chez les patients adultes CF permettent de compléter ces observations et de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques. Une étude sur les vertèbres de cadavres de patients CF transplantés ou non, montre une ostéopénie (Haworth *et al.*, 2000). Dans une analyse sur des patients CF d'environ 30 ans non traités par des bisphosphonates, ni greffés, une ostéopénie trabéculaire est observée : baisse de la connectivité trabéculaire, diminution du taux de formation osseuse et de la vitesse de minéralisation, réduction des marqueurs de résorption sans modulation du nombre d'ostéoclastes.

Beaucoup d'autres travaux mettent, également, en cause les facteurs secondaires liés à la mucoviscidose tels que des lésions viscérales, une hypovitaminose K et D, un retard pubertaire, une hypogonadisme, une activité physique restreinte, des infections chroniques mais aussi induits par les traitements reçus (corticoïdes et immunosuppresseurs) (Figure 18).

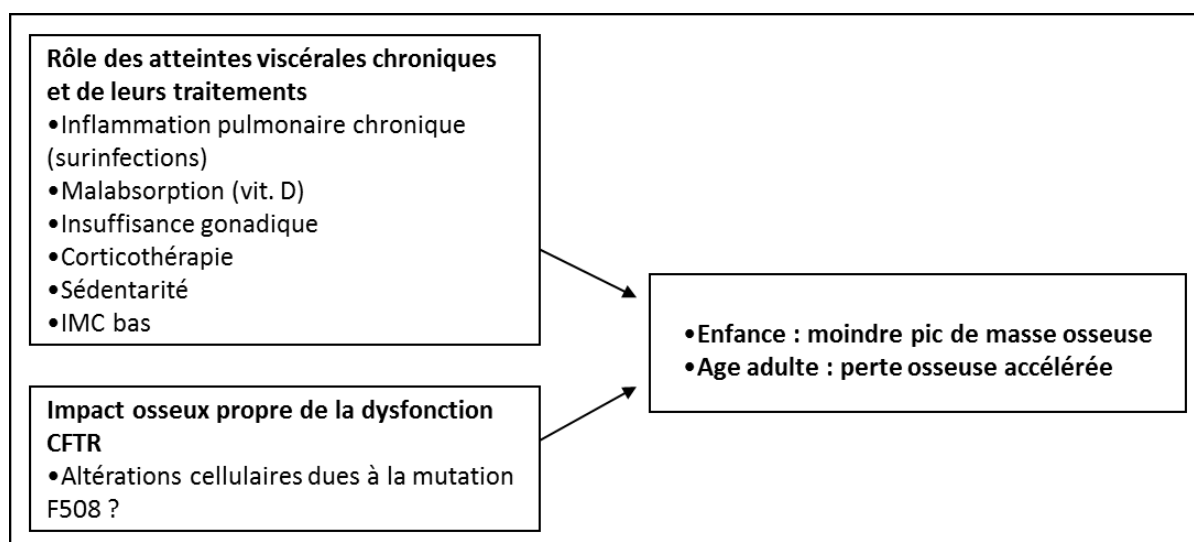


Figure 18 : les mécanismes physiopathologiques de l'atteinte osseuse au cours de la mucoviscidose (d'après Javier and Jacquot, 2011)

Mais des études récentes incriminent le dysfonctionnement de la protéine CFTR dans cette maladie osseuse. En effet, jusqu'à récemment, peu d'études ont été réalisées sur le rôle de la protéine CFTR et l'impact de sa mutation F508del-CFTR dans les processus moléculaires de formation et résorption osseuse (Tableau 6).

| Mutations / inhibition de CFTR | Impact sur le métabolisme osseux | Références |
|--|---|------------------------------|
| Modèle murin <i>Cftr</i> ^{-/-} (âgé de 3 sem.) | Ostéopénie et déminéralisation osseuse (observées chez la souris mâle et femelle) | Dif <i>et al.</i> , 2004 |
| Modèle murin <i>Cftr</i> ^{-/-} (âgé de 8, 12 et 28 sem.) | Ostéopénie, déminéralisation et réduction de la densité et de la formation osseuse (observée chez la souris mâle et femelle) | Haston <i>et al.</i> , 2008 |
| Modèle murin <i>Cftr</i> ^{-/-} corrigé par hCFTR intestinal (âgé de 14 sem.) | Ostéopénie et déminéralisation (souris mâle et femelle). Réduction du taux de la formation osseuse observée uniquement chez la souris femelle | Pashuck <i>et al.</i> , 2009 |
| Culture d'ostéoblastes humains normaux en présence de l'inhibiteur pharmacologique CFTR-inh172 | Réduction de la production de l'ostéoprotégérine (OPG) et augmentation de la production de la prostaglandine E2 (PGE2) | LeHeron <i>et al.</i> , 2010 |

Tableau 6 : Impact du déficit fonctionnel de CFTR dans le métabolisme osseux (d'après Javier and Jacquot, 2011)

En 2004, les premiers travaux sur les modèles invalidés pour le gène *Cftr* montrent une réduction très marquée de la masse osseuse trabéculaire et corticale et une ostéopénie sévère dès l'âge de 3 semaines (Dif *et al.*, 2004). Les mêmes observations sont faites sur des souris plus âgées : 6, 12 et 28 semaines, en absence de maladies gastro-intestinale et respiratoire (Haston *et al.*, 2008).

Dans ce modèle, est rapportée aussi une déficience de la fonction musculaire squelettique entraînant une perte de la force diaphragmatique respiratoire (Divangahi *et al.*, 2009). Récemment, une étude réalisée sur ce modèle de souris KO mais modifié par une correction transgénique intestinale exprimant la protéine WT-CFTR d'origine humaine (qui permet aux souris d'avoir une alimentation normale), a confirmé la réduction de la minéralisation osseuse et du taux de formation osseuse. Ceci n'est observé que chez les souris femelles *Cftr*^{-/-} (Pashuck *et al.*, 2009). En comparaison avec les études humaines, cela reste obscur : la densité minérale osseuse est plus faible chez les hommes que chez les femmes contrairement aux souris (Haworth *et al.*, 1999 ; Elkin *et al.*, 2001 ; Haworth, 2010). En dépit de cette ostéopénie, le nombre d'ostéoclastes et d'ostéoblastes n'est pas modifié suggérant que la protéine CFTR influence l'activité cellulaire osseuse. En 2007, l'expression de la protéine CFTR dans l'ostéoblaste est mise en évidence sur des coupes osseuses humaines (Shead *et al.*, 2007) mais aussi au niveau de l'ostéoblaste, de l'ostéoclaste et de l'odontoblaste humains et murins (Bronckers *et al.*, 2010).

B. Les facteurs impliqués et les traitements potentiels

Ces dernières observations laissent supposer un rôle physiologique du canal chlorure CFTR dans la formation osseuse. Un dysfonctionnement de cette protéine dans les cellules osseuses pourrait contribuer à une dérégulation de l'expression de gènes impliqués dans l'ostéogenèse. Nous avons montré récemment, que l'inhibition pharmacologique de la fonction chlorure dépendant de CFTR sur les ostéoblastes humains modifie le taux de production d'OPG et de PGE2, deux régulateurs clés des processus de formation/résorption osseuse (Le Heron *et al.*, 2010). Shead EF *et al.* ont étudié, chez les patients adultes CF, les effets de l'inflammation sur le nombre d'ostéoclastes et leur fonction, au cours d'épisodes d'infections pulmonaires traitées par des antibiotiques en intraveineux. Ils montrent une corrélation positive entre le nombre d'ostéoclastes et le TNF- α , et une corrélation négative entre le nombre d'ostéoclastes et le taux sérique d'OPG (Shead *et al.*, 2006 ; Shead *et al.*, 2010).

Le traitement préventif de la diminution de la densité minérale osseuse dans la mucoviscidose nécessite la prise en charge de tous les aspects de la maladie, notamment le maintien d'une bonne fonction respiratoire et le traitement des surinfections bronchiques, un apport calcique optimal et une activité physique régulière (Sermet-Gaudelus *et al.*, 2007).

Une insuffisance en vitamine D est fréquente chez les patients CF et est associée à une maladie osseuse. Une dose optimale n'a pas été établie mais focalisée sur les dosages de personnes non CF (Gore *et al.*, 2011). Le traitement au long cours repose sur une administration quotidienne. Mais il est insuffisant en cas d'insuffisance vitaminique D ou de déficit osseux. A ce moment-là, de fortes doses peuvent être proposées (Sermet-Gaudelus *et al.*, 2007).

Le calcium est un composant important de la structure osseuse et est essentiel au bon maintien du squelette. Schulze *et al.* ont montré une augmentation de l'absorption du calcium chez de jeunes filles CF. Ce mécanisme est associé à une augmentation des taux de dépôts calciques osseux (Schulze *et al.*, 2004). La dose optimale d'administration reste encore à être déterminée mais la

fondation américaine CF (CF foundation bone health consensus committee) recommande une supplémentation journalière de 1300 à 1500 mg de calcium.

La vitamine K est nécessaire pour l'activation post-transcriptionnelle de l'ostéocalcine, molécule importante pour la formation et la minéralisation osseuses (Nicolaidou *et al.*, 2006 ; Drury *et al.*, 2008). Le « guide pratique du médecin » recommande une supplémentation en vitamine K bien qu'il n'y ait que 2 articles indiquant une amélioration grâce à cette supplémentation (Gore *et al.*, 2010). Cela ne se justifie que d'un point de vue théorique afin de favoriser l'ostéogénèse et elle est surtout conseillée pour une prévention (Sermet-Gaudelus *et al.*, 2007).

Les patients adolescents CF ont une diminution du taux de leurs hormones sexuelles par rapport à leur contrôle de même âge et de même sexe (Boas *et al.*, 1996 ; Johannesson *et al.*, 1998). Le ratio bénéfice/risque d'une complémentation en hormones sexuelles n'a pas encore été bien analysé. La supplémentation des hormones gonadiques reste très controversé (Landon and Rosenfeld, 1984 ; Aris *et al.*, 2005). Les enfants CF en retard de croissance devraient être adressés à un endocrinologue (Gore *et al.*, 2010). Cela peut être dû, en partie, au faible taux d'IGF-I. Ainsi des traitements aux hormones de croissance permettent de diminuer les hospitalisations, une augmentation de la masse osseuse et une diminution des antibiothérapies (Schibler *et al.*, 2003 ; Hardin *et al.*, 2005a,b,c,d ; Hardin *et al.*, 2006 ; Vanderwel and Hardin, 2006). D'autres hormones peuvent être une option thérapeutique pour les patients CF comme la teriparatide. C'est un peptide (1-34) de l'hormone parathyroïdienne qui a une activité anabolique et catabolique sur l'os selon la dose et le temps utilisés (Dempster *et al.*, 1993 ; Finkelstein *et al.*, 2003 ; Jilka, 2007).

Les bisphosphonates sont des agents antirésorbants, analogues synthétiques du pyrophosphate. C'est une classe de drogue qui fixe l'hydroxyapatite dans l'os et diminue la résorption osseuse inhibant la fonction et la survie des ostéoclastes (Koné-Paut *et al.*, 2002). Leur utilisation est large : chez l'adulte, dans la maladie de Paget et des douleurs osseuses néoplasiques ; chez l'enfant, pour les hypercalcémies et l'ostéogénèse imparfaite. Dans la mucoviscidose, leur indication est très discutée, compte tenu de l'absence de preuves claires d'une hyper-résorption (Sermet-Gaudelus *et al.*, 2007). A long terme, les bisphosphonates peuvent avoir des effets secondaires chez l'enfant et notamment une inhibition du remodelage osseux (Whyte *et al.*, 2008). Ils peuvent être indiqués chez l'enfant en attente d'une transplantation pulmonaire et sous glucocorticoïdes (Ward *et al.*, 2007 ; Sermet-Gaudelus *et al.*, 2011). Les traitements par inhibiteurs de la résorption osseuse, dans la mucoviscidose, est encore limitée. Plusieurs molécules ont été testées : le Pamidronate® (Haworth *et al.*, 1998 ; Ringuier *et al.*, 2004 ; Aris *et al.*, 2005), le zolédronate (Chapman *et al.*, 2009), l'Etidronate, l'Alendronate (Aris *et al.*, 2004 ; Pande and Hosking, 2005 ; Papaioannou *et al.*, 2008). Les suppléments en calcium et en vitamine D doivent être arrêtés avant l'utilisation des bisphosphonates (Gore *et al.*, 2010).

Un autre antirésorbant utilisé est le dénosumab. C'est un anticorps monoclonal anti-RANKL. Il a été récemment approuvé par la FDA pour le traitement de l'ostéoporose post-ménopause. Il inhibe la maturation des ostéoclastes en se fixant sur RANKL (Cummings *et al.*, 2009). Il montre un effet plus important avec une augmentation de la densité osseuse que ce soit au niveau cortical et trabéculaire. Il pourrait donc être intéressant de l'utiliser chez les patients CF (Gore *et al.*, 2010).

Les protéines de la famille de Wnt sont de régulateurs clés du remodelage osseux et d'autres processus cellulaires (Krishnan *et al.*, 2006 ; Baron and Rawadi, 2007 ; Glass and Karsenty, 2007). Plusieurs molécules sont des pistes ou en cours d'analyse pour augmenter la masse osseuse chez les patients CF : un anticorps antisclectrotine permettant une augmentation de la signalisation Wnt et de la masse osseuse (Gardner *et al.*, 2005 ; Li *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2009 ; Ominsky *et al.*, 2008 ; Ominsky *et al.*, 2010) ; un anticorps anti-Dkk1 permettant l'augmentation du volume trabéculaire osseux et de la formation osseuse (Li *et al.*, 2006 ; Morvan *et al.*, 2006 ; Semenov *et al.*, 2008).

OBJECTIFS

OBJECTIFS

Cette étude bibliographique montre l'intérêt de l'étude du rôle possible de la protéine CFTR dans le développement osseux et les processus physiopathologiques osseux. Comme il a été souligné dans des revues récemment publiées (Gore *et al.*, 2010 ; Haworth, 2010 ; Paccou *et al.*, 2010 ; Shead *et al.*, 2010 ; Javier and Jacquot, 2011 ; Sermet-Gaudelus *et al.*, 2011), l'étude de la fonction de la protéine CFTR et de l'impact de la mutation F508del-CFTR dans la formation et la qualité osseuse devrait permettre l'identification de nouveaux gènes et de molécules cibles régulateurs de l'ostéof ormation dépendante de la protéine CFTR et, à terme de développer des stratégies thérapeutiques innovantes pour stimuler et maintenir la masse et la minéralisation osseuse chez les patients CF jeunes et adultes.

Mon travail de thèse a eu 2 principaux objectifs :

1. Mon premier objectif a été de définir l'existence ou non d'une relation directe ou indirecte entre la dysfonctionnalité du canal CFTR et les anomalies des processus de formation – résorption de l'os dans un modèle murin ayant la mutation homozygote F508del-CFTR, jeune et adulte, mâle et femelle. Jusqu'à aujourd'hui, ces études ont été réalisées sur des modèles murins invalidés pour le gène *Cftr*, corrigés ou non au niveau de l'absorption intestinale (Dif *et al.*, 2004 ; Haston *et al.*, 2008). Les résultats obtenus sont très hétérogènes en fonction des modèles mais aussi par rapport aux humains. Ce sont pour ces raisons que nous avons réalisé nos études à l'aide d'un modèle murin homozygote F508del-CFTR et à partir de cultures primaires humaines CF ayant une mutation hétérozygote ou homozygote F508del-CFTR.
2. Mon second objectif a été d'évaluer les améliorations du développement et du phénotype osseux de la souris F508del-CFTR mâle, sous l'effet d'un traitement par le miglustat (le N-butyldeoxynojirimicin, NB-DNJ, Zavesca). Le miglustat, décrit précédemment, est un inhibiteur de l' α -1,2 glucosidase, déjà prescrit dans la maladie de Gaucher (Elstein *et al.*, 2004), chez l'homme. Il fait actuellement l'objet d'un essai clinique de phase II (<http://clinicaltrials.gov/>) sur l'amélioration de la fonction pulmonaire chez des adultes CF. Des travaux préalables réalisés sur des muqueuses nasales CF et des cultures de lignées cellulaires pulmonaires F508del-CFTR ont montré des effets correcteurs significatifs du miglustat (Norez *et al.*, 2006 ; Noël *et al.*, 2008 ; Lubamba *et al.*, 2009 ; Norez *et al.*, 2009). Ainsi, notre objectif a été d'étudier, *in vivo*, chez la souris F508del-CFTR, mâle, jeune adulte, le rôle potentiel ostéoformateur du miglustat, administré par voie orale, dans l'amélioration de la formation et la masse osseuse.

RESULTATS

RESULTATS

I. La mutation F508del dans le gène *Cftr* réduit la masse et la formation osseuse

A. Etat des lieux

Au cours des trois dernières décennies, plusieurs travaux ont montré une densité minérale osseuse réduite, une masse osseuse diminuée et une augmentation des risques de fracture chez les enfants, les adolescents et les adultes CF (Aris *et al.*, 2005 ; Bianchi *et al.*, 2006 ; Gore *et al.*, 2010 ; Haworth, 2010 ; Paccou *et al.*, 2010 ; Sermet-Gaudelus *et al.*, 2011). La cause de cette fragilité osseuse est multifactorielle. Elle peut être induite par l'insuffisance en vitamine K, en vitamine D, la malabsorption du calcium, la malnutrition, l'utilisation de glucocorticoïdes, le retard pubertaire et les infections pulmonaires associées à une inflammation systémique. Tous ces facteurs sont bien connus pour être présents chez le patient CF (Ionescu *et al.*, 2000 ; Sermet-Gaudelus *et al.*, 2009 ; Javier and Jacquot, 2011 ; Sermet-Gaudelus *et al.*, 2011). Cependant, une faible densité minérale osseuse a été observée chez de très jeunes enfants ayant une atteinte pulmonaire modérée et un statut nutritionnel correct (Bianchi, 2007 ; Sermet-Gaudelus *et al.*, 2007). Plusieurs études ont suggéré un rôle de la protéine CFTR défectueuse, dans la diminution de la densité minérale et la masse osseuse, chez les patients CF (Bianchi, 2007 ; Sermet-Gaudelus *et al.*, 2007 ; Javier and Jacquot, 2011 ; Sermet-Gaudelus *et al.*, 2011).

Dans cette hypothèse, des études ont été réalisées dans un modèle murin (souris CFTR-KO) : ces souris n'ont pas d'inflammation systémique, ni d'infection pulmonaire. Elles montrent une diminution de la densité minérale osseuse, de l'os cortical et une altération de l'architecture trabéculaire. Ces souris semblent avoir un défaut d'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes sans modification de leur nombre (Dif *et al.*, 2004 ; Haston *et al.*, 2008 ; Pashuck *et al.*, 2009).

La présence de la protéine CFTR a été observée au niveau des ostéoblastes, des ostéoclastes et des odontoblastes humains et murins (Shead *et al.*, 2007 ; Bronkers *et al.*, 2010 ; Le Heron *et al.*, 2010). Dans notre laboratoire, il a été montré que l'inhibition pharmacologique du canal CFTR, au niveau des ostéoblastes humains, modifie la libération de la prostaglandine E2 (PGE2) et de l'ostéoprotégérine (OPG), deux régulateurs clés de la formation osseuse (Le Heron *et al.*, 2010).

Toutes ces données semblent converger vers une action plus ou moins directe de la protéine CFTR dans la régulation de l'activité ostéoblastique. Afin de mieux appréhender l'effet direct ou non de cette mutation sur la perte osseuse, nous avons évalué l'impact de la mutation F508del-CFTR dans la formation osseuse chez des souris homozygotes F508del, mâles et femelles.

B. Résultats

Les résultats obtenus lors de de mon travail de thèse ont fait l'objet de trois publications :

1. **The F508del mutation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene impacts bone formation.**

Le Henaff C., Gimenez A, Haÿ E, Marty C, Marie P, Jacquot J.

Am J Pathol. 2012 May;180(5):2068-75.

2. **Deficit of osteoprotegerin release by osteoblasts from a patient with cystic fibrosis**

Gimenez A, Le Henaff C., Norez C., Guillaume C., Ravoninjatovo B., Laurent-Maquin D., Becq F. and Jacquot J.

Eur Respir J. 2012 Mar;39(3):780-1

3. **Cystic fibrosis – related bone disease : Low osteoprotegerin production in primary osteoblasts from a cystic fibrosis patient with the homozygote F508del-CFTR mutation**

Le Henaff C., Tabary O., Gimenez-Maitre A., Guillaume C., Velard F., Barthe F., Sermet-Gaudelus I. and Jacquot J.

Soumis pour publication

1. Etude de l'impact de la mutation F508del-CFTR sur la formation osseuse dans le modèle murin

The F508del mutation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene impacts bone formation.

Le Henaff C, Gimenez A, Haÿ E, Marty C, Marie P, Jacquot J.

Am J Pathol. 2012 May;180(5):2068-75.

Musculoskeletal Pathology

The F508del Mutation in Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene Impacts Bone Formation

Carole Le Henaff,* Annelise Gimenez,* Eric Hay,†
Caroline Marty,† Pierre Marie,† and
Jacky Jacquot*

From the Equipe EA 4691,* Biomateriaux et Inflammation en Site Osseux, SFR CAP-Santé, FED 4231, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, and the Laboratory of Osteoblast Biology and Pathology,† Inserm UMR-G06, University Paris Diderot, Paris, France

The F508del mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*Cftr*) gene is believed to be an independent risk factor for cystic fibrosis-related bone disease. In this study, we evaluated the bone mineral density as well as the histomorphometric parameters of bone formation and bone mass in both F508del-*Cftr* homozygous mice (F508del *Cftr*^{tm1Eur}) and *Cftr*^{+/+} littermate controls at 6 (prepubertal), 10 (pubertal), and 14 (young adult) weeks of age in both sexes. The bone architecture of F508del *Cftr*^{tm1Eur} and wild-type (WT) littermate mice was evaluated by bone densitometry, microcomputed tomography, and analysis of the dynamic parameters of bone formation. Serum levels of both insulin-like growth factor 1 and osteocalcin also were determined. Reduced bone mineral density, lower femoral bone mass, and altered trabecular bone architecture were observed in F508del *Cftr*^{tm1Eur} mice compared with controls at 6, 10, and 14 weeks of age. A decrease in the bone formation rate in F508del *Cftr*^{tm1Eur} mice was shown compared with control mice, independently of age and sex. In addition, we found lower insulin-like growth factor 1 levels in F508del *Cftr*^{tm1Eur} mice compared with age-matched controls, whereas osteocalcin levels were normal. Severe osteopenia and altered bone architecture were found in young and mature adult F508del *Cftr*^{tm1Eur} mice. Our findings show that the F508del mutation in *CFTR* impacts trabecular bone mass by reducing bone formation. (*Am J Pathol* 2012, 180:2068–2075; DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.01.039)

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal-recessive disorder caused by mutations of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), a cAMP-dependent anion channel leading to progressive pulmonary damage and, ultimately, to death.^{1–3} Over the past 3 decades, reduced bone mineral density (BMD) and low bone mass has been reported in children, adolescents, and adults with CF, independently of sex, compared with the general population.^{4–8} Brittle bones in CF disease were confirmed by densitometric data, fracture incidence, and impaired quality of life in young patients.^{7,9} The cause of the CF-related low BMD is multifactorial including vitamin K and D insufficiencies, calcium malabsorption, malnutrition, glucocorticoid use, delayed puberty, and pulmonary infection/systemic inflammation.^{8,10–12} The bone disease occurs around puberty owing to a poor acquisition of peak bone mass and worsens with age.^{6,13} However, low BMD has been observed in CF children younger than the age of 6 years with mild disease and normal nutritional status, suggesting that CF-related low BMD also may be owing to the intrinsic defect (ie, CFTR dysfunction).^{14,15} Whether CFTR activity plays a direct role in the low bone mass in children with CF is unknown, but can be hypothesized on the basis of animal studies in the CFTR-null mouse. Smaller bones with decreased BMD, cortical bone thinning, and altered trabecular architecture were found in

Supported in part by grants from the French cystic fibrosis association, Vaincre la Mucoviscidose (grants RCB0905 and RF20110600482) and the Champagne-Ardenne Région, France (convention D200911226).

Accepted for publication January 19, 2012.

Author contributions: P.J.M. and J.J. designed the research; C.L.H., A.G., E.H., and C.M. performed the research; C.L.H., A.G., E.H., C.M., P.J.M., and J.J. analyzed data; and C.L.H., P.J.M., and J.J. contributed to writing the manuscript.

Current address for C.L.H., A.G., and J.J., Equipe EA 4691, Biomateriaux et Inflammation en Site Osseux, SFR CAP-Santé, FED 4231, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France.

Address reprint requests to Jacky Jacquot, Ph.D., Equipe EA 4691, Biomateriaux et Inflammation en Site Osseux, SFR CAP-Santé, FED 4231, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51100, Reims, France. E-mail: jacky.jacquot@inserm.fr.

Cftr^{-/-} mice despite no difference in osteoblast and osteoclast numbers as compared with control mice, suggesting that CFTR protein may influence bone cell activity rather than number.^{16,17} Another study¹⁸ reported sex-related differences in the bone formation rate of gut-corrected *Cftr*^{-/-} mice, suggesting inadequate bone formation in females but increased formation in males. The expression of CFTR protein has been identified by immunohistochemistry in human bone cells.¹⁹ We previously reported the expression of CFTR mRNA and protein in primary human osteoblasts (cells that form bone) and showed that inhibition of CFTR-mediated Cl⁻ channel activity affects the release of osteoprotegerin and prostaglandin E₂, two key regulators of bone formation.²⁰ We recently discovered a defective CFTR Cl⁻ channel activity and a deficit of osteoprotegerin production by primary osteoblasts from a 25-year-old CF patient with the F508del/G542X mutation in CFTR.²¹ One study in patients with CF with at least one F508del allele showed a direct association between the F508del mutation and low BMD in both sexes.²² However, the impact of the F508del allele mutation in CFTR on bone formation and bone mass remains unknown. In this study, we evaluated the impact of the F508del mutation in CFTR on the BMD status and bone formation in F508del-CFTR homozygous mice in relation to age (prepubertal, pubertal, and young adult) and sex compared with normal *Cftr*^{+/+} littermates.

Materials and Methods

Mice

Rotterdam homozygous F508del-CFTR mice (F508del *Cftr*^{tm1Eur}) that express the clinically common F508del mutation in *Cftr* at wild-type (WT) protein level and their normal *Cftr*^{+/+} homozygous littermates (in the FVB background)²³ were obtained from the Centre de Distribution, Typage et Archivage Animal, Centre National de la Recherche Scientifique (Orléans, France). At 6, 10, and 14 weeks of age, F508del *Cftr*^{tm1Eur} and *Cftr*^{+/+} littermate (WT-CFTR) male and female mice were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (80 mg/kg; Virbac,

Carros, France) and xylazine (20 mg/kg Rompun; Bayer, Leverkusen, Germany) as previously described.²⁴

Dual-Energy X-Ray Absorptiometry, Scanning Electron Microscopy, and X-Ray Spectra

The BMD (mg/cm²) of total body and femoral bones free of soft tissue were measured from groups of 8 to 10 F508del *Cftr*^{tm1Eur} and WT-CFTR mice using a PIXImus mouse densitometer (software version 1.44; Lunar GE Medical Systems, Paris, France). The femoral bones were stored in 70% ethanol and dehydrated in graded ethanol, defatted in xylene, and embedded in methyl methacrylate. Measurements of total calcium (Ca²⁺) and phosphate (P) atomic concentrations in undecalcified femoral sections from X-ray spectra were performed to calculate a mean value of the Ca/P atomic ratio, indicative of calcium phosphate levels in the bone,²⁵ as reported in our laboratory.²⁶

Bone Histomorphometry

Two nonconsecutive sections of femoral bones were stained for tartrate-resistant acid phosphatase detection using naphthol AS-TR phosphate (Sigma, St. Quentin Fallavier, France) as substrate and then counterstained with toluidine blue (pH 4.3). The bone surface, trabecular bone volume, trabecular bone width, and trabecular separation were measured using a software package developed for bone histomorphometry (Microvision, Evry, France). Osteoclast numbers expressed as N.Oc/T.Ar (per mm²) were evaluated on tartrate-resistant acid phosphatase-stained sections. Histomorphometric parameters were recorded at this standard sampling site in compliance with the recommendations of the American Society for Bone and Mineral Research Histomorphometry Nomenclature Committee.²⁷ Double labeling of tetracycline and calcein *in vivo* was performed as described.²⁸ The mineral apposition rate was calculated according to the American Society for Bone and Mineral Research nomenclature. Femoral bones of 6-week-old F508del *Cftr*^{tm1Eur} and WT-CFTR mice were scanned with microcomputed tomography (μ CT-40; Scanco Medical

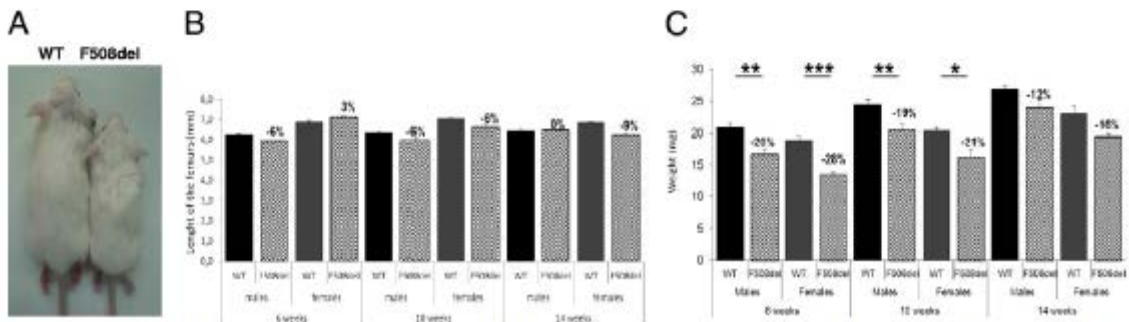


Figure 1. F508del *Cftr*^{tm1Eur} mice had lower body weight compared with WT control mice at 6, 10, and 14 weeks of age. **A:** Six-week-old WT control and F508del *Cftr*^{tm1Eur} male mice. **B:** Femur length was not significantly different between F508del *Cftr*^{tm1Eur} and WT control mice between both sexes and at all ages. **C:** A lower weight in F508del *Cftr*^{tm1Eur} mice was found compared with WT control mice in both sexes and at all ages. Data are mean \pm SEM for 8 to 10 animals per group. Statistical differences are indicated by analysis of variance. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001.

AG, Brüttiselen, Switzerland) to assess three-dimensional bone morphology.

Serum Analysis

Sera were obtained from F508del *Cfr*^{tm1Eur} and WT-CFTR mice and stored at -85°C until analysis of duplicate samples. In the active insulin-like growth factor 1 (IGF-1) enzyme-linked immunosorbent assay, IGF-1 was separated from its binding proteins in serum by using an ethanol and HCl-based extraction solution provided by the manufacturer (Millipore, Molsheim, France). Analysis of bone turnover biomarkers was undertaken with a commercial assay (enzyme-linked immunosorbent assays for osteocalcin, IL-6, and tumor necrosis factor- α ; Millipore).

Statistical Analysis

Data are presented as mean \pm SEM for 6 to 10 animals per group. Significance of the *in vivo* response was determined using one-way analysis of variance with Dunnett post hoc analysis. Significance between groups was determined using two-way analysis of variance with Bonferroni post hoc analysis. A *P* value <0.05 was considered significant.

Results

F508del CFTR Mutation Results in a Decreased Bone Mass

In a recent study it was reported that femurs of adult F508del *Cfr*^{tm1Eur} mice of 11 to 15 weeks of age presented with a significantly lower bone volume compared with *Cfr*^{+/+} controls whereas weight, length, and BMD were similar in the two mouse groups.²⁹ In our study, measures of body weight, femur length, and BMD were performed in growing F508del *Cfr*^{tm1Eur} mice at 6 weeks (prepubertal), 10 weeks (pubertal), and 14 weeks (young adult) of age in both sexes. No significant difference in femur length was observed between F508del *Cfr*^{tm1Eur} mice and sex-matched controls in all ages. As expected, the average body weight of F508del *Cfr*^{tm1Eur} mice was 24%, 20%, and 14% less than control mice at 6, 10, and 14 weeks of age, respectively (Figure 1, A–C).

We then examined bone microarchitecture in 6-week-old mice of both genotypes by microcomputed tomography. Representative three-dimensional images of the distal femur are shown in Figure 2A. The plate-like structure of the trabecular bone was reduced markedly, and the connecting rods of trabeculae were disrupted in F508del *Cfr*^{tm1Eur} mice compared with sex-matched WT controls. We further assessed BMD of F508del *Cfr*^{tm1Eur} mice and their littermate controls by dual-energy X-ray absorptiometry at 6, 10, and 14 weeks of age. At 6 weeks, the whole-body BMD in F508del *Cfr*^{tm1Eur} mice was reduced significantly (6% and 15% in males and females, respectively) compared with sex-matched controls (Figure 2B). The reduction in BMD was more pronounced in F508del *Cfr*^{tm1Eur} mice when femurs were analyzed separately in both sexes, namely a 14% and 22% reduction of BMD in femurs of male and

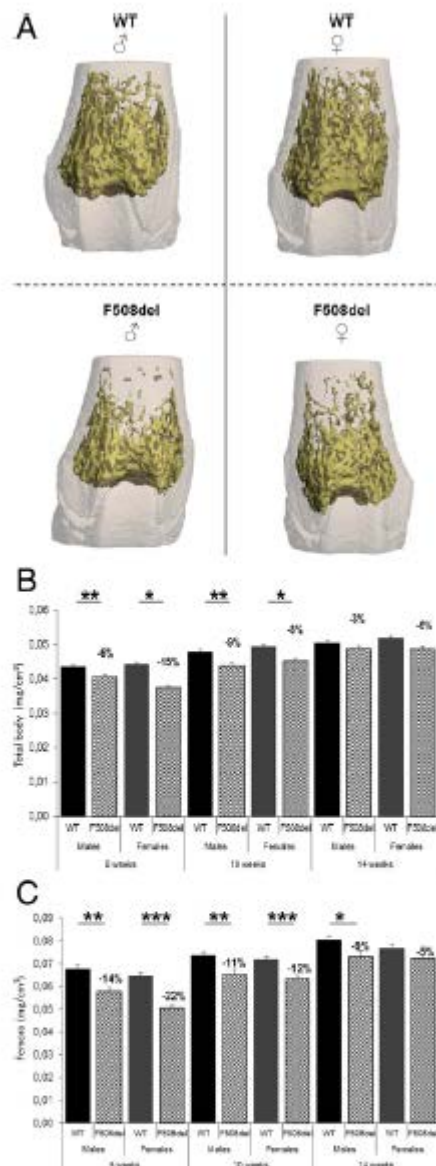


Figure 2. F508del *Cfr*^{tm1Eur} mice had lower bone mass and BMD compared with WT control mice at 6, 10, and 14 weeks of age. **A:** Morphology study by microcomputed tomography scanning of trabecular bone in the femurs of 6-week-old WT control and F508del *Cfr*^{tm1Eur} mice. Note that the plate-like architecture of the trabecular bone is reduced markedly and the connecting rods of trabeculae are disrupted in F508del *Cfr*^{tm1Eur} mice compared with WT control mice, in both sexes. **B** and **C:** BMD values measured from total body and femur, respectively, were lower in F508del *Cfr*^{tm1Eur} mice compared with WT control mice at 6, 10, and 14 weeks of age. A trend toward BMD normalization in both whole body and femoral bone was observed in 14-week-old F508del *Cfr*^{tm1Eur} mice, which was more pronounced in females. Data are mean \pm standard error of the mean for 8 to 10 animals per group. Statistical differences are indicated by analysis of variance. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001.

female 6-week-old F508del *Cfr*^{tm1Eur} mice, respectively, compared with sex-matched controls (Figure 2C). The reduction in BMD persisted in both whole body and femurs of 10-week-old F508del *Cfr*^{tm1Eur} mice in both sexes. However,

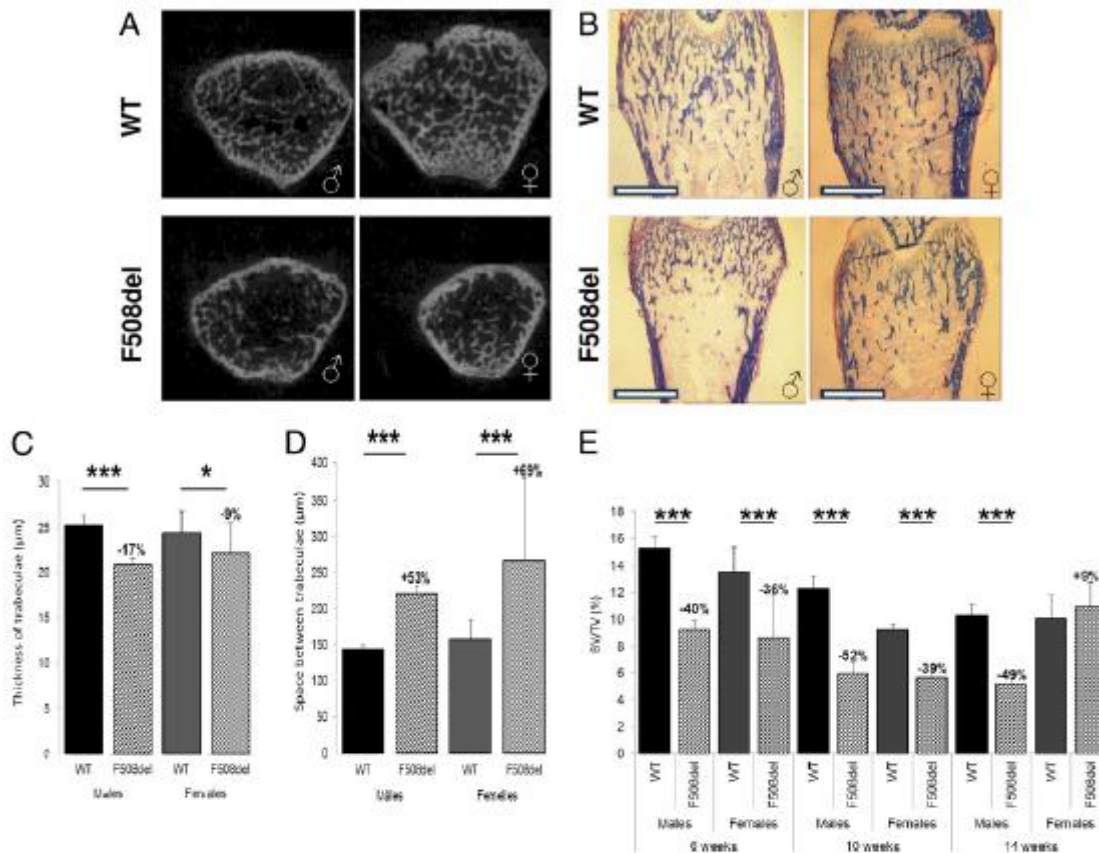


Figure 3. Static histomorphometric parameters of bone structure in WT control and F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice. **A:** Representative two-dimensional sectional scans showed thinner trabeculae of femoral bone in 6-week-old F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice compared with WT control mice, in both sexes. **B:** Representative sagittal sections of femoral bones in 6-week-old F508del *Cfr^{tm1Eur}* and WT control mice. Scale bar = 0.75 mm. **C and D:** Significant increases in thickness of trabeculae and in space between trabeculae, respectively, were observed in 6-week-old F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice compared with WT control mice, in both sexes. **E:** The femur of F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice had decreased trabecular bone volume at both 6 and 10 weeks in both sexes whereas trabecular bone volume was normalized in F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice at 14 weeks of age. In females but not in males. Data are mean \pm standard error of the mean for 8 to 10 animals per group. Statistical differences are indicated by analysis of variance. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$.

there was a trend toward BMD normalization in both whole body and femoral bone in 14-week-old F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice, which was more pronounced in females (Figure 2C).

F508del CFTR Mutation Results in Altered Bone Architecture

We next assessed architectural parameters in femoral sagittal sections from F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice by micro-computed tomography and histologic measurements (Figure 3). In the femur of 6-week-old F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice, two-dimensional coronal sections adjacent to the growth plate (Figure 3A) showed reduced trabecular bone compared with sex-matched controls in both sexes. Figure 3B shows a reduction of trabecular bone in distal femoral sections of 6-week-old F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice in both sexes. Quantification of structural parameters revealed that bone volume/tissue volume (percentage of trabecular bone volume) was decreased by 40% and

36% in 6-week-old F508del *Cfr^{tm1Eur}* male and female mice, respectively, compared with sex-matched controls. Trabecular thickness was decreased by 17% and 9% in 6-week-old F508del *Cfr^{tm1Eur}* male and female mice, respectively, confirming the microcomputed tomography findings. Trabecular separation was increased by 53% and 69% in 6-week-old F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice, respectively, in both sexes (Figure 3, C and D). As shown in Figure 3E, the decrease of trabecular bone volume in femurs of F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice persisted at both 6 and 14 weeks whereas trabecular bone volume was normalized in F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice at 14 weeks of age, in females but not in males.

F508del CFTR Mutation Results in Reduced Bone Formation

Bone remodeling is a process that includes the tight coupling between bone formation and bone resorption.

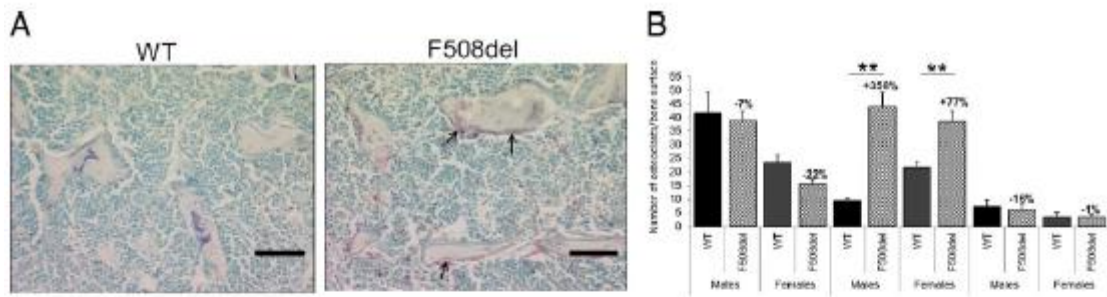


Figure 4. Osteoclast number in femoral bones of WT control and F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice. **A:** Representative images of tartrate-resistant acid phosphatase-stained sections showing osteoclasts (arrows) from 6-week-old WT control and F508del *Cfr^{tm1Eur}* female mice. Original magnification, $\times 50$. Scale bar = 10 μm . **B:** No significant difference in the osteoclast number/bone surface was observed in 6- and 14-week-old F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice compared with sex-matched control mice. In contrast, a significant increase in osteoclast number was found in F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice at 10 weeks in both sexes. Data are mean \pm standard error of the mean for 8 to 10 animals per group. Statistical difference is indicated by analysis of variance. ** $P < 0.01$.

Because the F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice showed decreased bone mass, we examined whether these changes were related to the alterations in tartrate-resistant acid phosphatase-positive osteoclasts, a specific marker indicative of the rate of bone resorption (Figure 4A). Quantitative analysis of osteoclasts (N.Oc/T.Ar) lining the femoral trabecular bone at 6, 10, and 14 weeks of age is shown in Figure 4B. No significant difference in osteoclast number was observed in 6- and 14-week-old F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice compared with sex-matched control mice. In contrast, a significant increase in osteoclast number was found in F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice at 10 weeks in both sexes (Figure 4B).

To analyze bone formation dynamics, the rate of new bone apposition (ie, the trabecular mineral appositional rate) was evaluated *in vivo* after double labeling with tetracycline and calcein in F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice (Figure 5A). We found that the mineral apposition rate in F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice was consistently lower than in sex-matched controls, at all ages (Figure 5B). To investigate whether bone defects observed in F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice are related to nutritional deficiency and altered mineral homeostasis, we measured the total cal-

cium and phosphate atomic ratio in undecalcified bone trabecular sections by X-ray analysis. No significant change in the Ca/P atomic ratio in bones from X-ray spectra was found between the F508del *Cfr^{tm1Eur}* and control mice at 14 weeks of age, in both sexes (Table 1). To further investigate whether bone defects observed in F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice may be related to alteration in changes of circulating levels of bone-growth factors, we measured levels of serum IGF-1 and osteocalcin in F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice compared with control mice at 6, 10, and 14 weeks of age (Figure 6). We found lower levels of serum IGF-1 in F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice compared with age-matched control mice (Figure 6A). Control WT mice showed an expected increase in IGF-1 with time, which was less pronounced in F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice. No significant difference was observed in the serum level of osteocalcin between F508del *Cfr^{tm1Eur}* and control WT mice (Figure 6B).

Discussion

Our data clearly indicate that F508del mutation in CFTR results in decreased bone mass and bone formation,

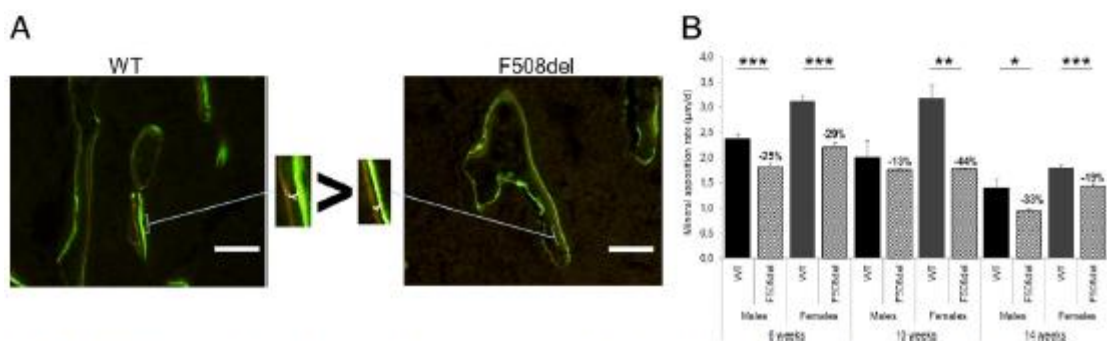


Figure 5. F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice had a lower rate of bone formation compared with WT control mice at all ages, in both sexes. **A:** *In vivo* analysis of bone formation in 6-week-old WT control and F508del *Cfr^{tm1Eur}* female mice, fluorescent images of two representative sections of trabecular surface showing tetracycline and calcein double-fluorochrome labeling. White crockets specify the distance between labeled bone surfaces, labeling for calcein was reduced in F508del *Cfr^{tm1Eur}* compared with WT control mice. Scale bar = 10 μm . **B:** The femur from F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice had decreased mineral apposition rate compared with sex-matched WT controls at 6, 10, and 14 weeks of age. Statistical differences are indicated by analysis of variance. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$.

Table 1. Ca/P Atomic Ratio of Femoral Bones in 14-Week-Old F508del *Cfr^{tm1Eur}* and Sex-Matched WT Mice

| Genotype | Sex | N | Ca/P atomic ratio | P value |
|----------|--------|---|-------------------|---------|
| WT | Male | 3 | 1.62 ± 0.01 | NS |
| F508del | Male | 3 | 1.63 ± 0.03 | NS |
| WT | Female | 3 | 1.57 ± 0.02 | NS |
| F508del | Female | 3 | 1.58 ± 0.02 | NS |

Undecalcified femoral sections coated with a conductive layer (carbon) of 14-week-old WT control and F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice were observed using a LaB6 electron microscope (JEOL JSM-5400LV) operating at 15 kV, which is equipped with an ultra-thin window Si (Li) detector for X-ray measurements. The Ca/P values represent the means ± standard error of the mean of three distinct areas analyzed in three femoral sections for three animals per group.

Ca/P, the atomic ratio of total calcium/phosphates in trabecular bone measured on the basis of high resolution X-ray spectra; NS, not significant.

independently of sex. A severe osteopenic phenotype was seen in 6-week-old F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice, with reduced BMD, lower bone mass, and reduction in the number and thickness of trabeculae compared with control littermates. This phenotype was associated with a decreased rate of new bone formation at all ages. In addition, at 10 weeks (pubertal age), we found that the number of osteoclasts was increased in F508del *Cfr^{tm1Eur}* female and male mice compared with sex-matched controls, supporting the idea that high bone turnover was increased in F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice at this pubertal period. We found a persistent deficit in both BMD and bone mass in F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice despite significant, quantitative improvements in females at 14 weeks of age (young adult age). Although F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice are, on average, smaller than their control littermates, we show that the observed osteopenic phenotype cannot be ascribed only to the reduced size of CF mice. Compared with sex-matched controls, a lower trabecular bone volume consistently was found in F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice, which was more pronounced in males. Our data therefore do not support the sex-related differences in bone loss described in the gut-corrected *Cfr^{-/-}* mouse model, reporting inadequate bone formation in females but increased bone formation in males.¹⁸

By using quantitative microcomputed tomography imaging of femurs, Paradis et al²⁹ reported reduced bone volume in adult F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice although measures of weight, length, BMD, and osteoclast numbers were similar to those of control littermates. Our data support some of these observations by showing a strong reduction (49%) in bone volume and no significant change in BMD of femoral bone in adult F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice in both sexes. Also in agreement with the latter, we noted that osteoclast number in femurs of 14-week-old F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice did not differ from those in control mice. We also found a slower rate in bone formation in F508del *Cfr^{tm1Eur}* male and female mice compared with sex-matched controls. Given the lower bone volume now reported in two CF animal models (B6 *Cfr^{tm1Kth}* and *Cfr^{tm1Eur}* mice) with the F508del mutation (this study and the study by Paradis et al²⁹), all data suggest that the F508del mutation in CFTR does not increase the osteoclast number, but rather may modify

the activity of bone cells. It is therefore reasonable to hypothesize that the effects of F508del CFTR on bone cells may depend on the stage of development (ie, growing versus adult F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice). This may very well reflect a different regulation of the osteoblast/osteoclast balance in growing individuals. Indeed, in growing individuals, bone formation must exceed bone resorption to gain bone mass, allowing skeletal growth. On the other hand, during the growth phase, balanced bone resorption is essential for mineralized cartilage and woven bone erosion, two processes that contribute physiologically to longitudinal development. In our growing 10-week-old F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice, we show a higher osteoclast number compared with 6- and 14-week-old F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice. Therefore, the regulation of osteoblast and osteoclast activities must be different in growing mice compared with young adult mice. Whatever they might be, our results show that F508del mutation in CFTR in growing mice can physiologically dissociate osteoclast function from osteoblast function, with a higher bone resorption activity in the stage of bone trabecular development, contributing to an osteopenic phenotype. These findings are consistent with clinical studies reporting that levels of bone turnover markers were higher in F508del

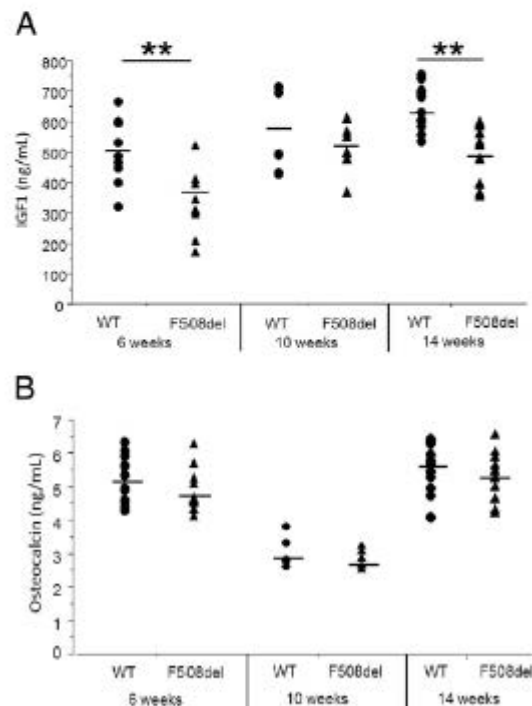


Figure 6. Serum IGF-1 and osteocalcin levels in F508del *Cfr^{tm1Eur}* mice. **A:** Serum IGF-1 levels were lower in F508del *Cfr^{tm1Eur}* compared with WT control mice, in all ages. **B:** No significant difference in serum levels of osteocalcin was observed between F508del *Cfr^{tm1Eur}* and WT control mice. Blood collected by cardiac puncture in anesthetized animals was analyzed at 6 weeks (WT, 5 females and 5 males; F508del, 5 females and 5 males), at 10 weeks (WT, 2 females and 2 males; F508del, 3 females and 3 males), and at 14 weeks of age (WT, 5 females and 6 males; F508del, 5 females and 6 males). Statistical difference is indicated by analysis of variance. ***P* < 0.01.

homozygous CF patients compared with healthy controls³⁰ and were more evident in male compared with female patients with CF.²² Our finding that F508del *Ctfr*^{tm1Eur} mice are characterized by decreased new bone formation, independently of age and sex, may be relevant to patients with CF with the F508del mutation. Consistently, three clinical reports through histomorphometric data in young adult CF patients revealed both a reduced BMD and lower trabecular bone volume compared with age- and sex-matched healthy control subjects, which was ascribed to low bone formation.^{31–33}

A link between reduced BMD, bone resorption, and alteration in bone turnover markers has been described accompanying exacerbations of lung infection with systemic inflammation in CF patients.^{12,34} A recent study showed a positive correlation between osteoclast number and serum levels of tumor necrosis factor- α and osteocalcin in CF patients.³⁵ The F508del *Ctfr*^{tm1Eur} mouse strain studied here has not been reported previously to develop lung inflammatory disease,²³ although recent data based on quantitative lung histology showed mild inflammation in mature adult (16 to 19 weeks) F508del *Ctfr*^{tm1Eur} mice compared with normal mice, under pathogen-free conditions.³⁶ In the present study, we found no significant difference in the serum osteocalcin level between F508del *Ctfr*^{tm1Eur} and control mice, as well as in the serum levels of tumor necrosis factor- α and IL-6 cytokines (data not shown).

Although much attention has been focused on growth deficits in children, adolescents, and adults, evidence suggests that individuals with CF show abnormalities at birth. Circulating levels of IGF-1 have been shown to directly regulate bone growth and density.³⁷ Studies have indicated that CF newborns are shorter and have a lower body weight than non-CF newborns.³⁸ Additional studies have suggested that the reduced levels of serum IGF-1 might be responsible, at least in part, for the growth defect reported in patients with CF,³⁹ which also was observed in both *Ctfr*^{-/-} mouse and newborn *Ctfr*^{-F508} pig models.^{40,41} IGF-1 has been identified as an independent predictor of low BMD in CF patients⁴² and in *Ctfr*^{-/-} mice.⁴¹ In the present study, serum IGF-1 level was lower in F508del *Ctfr*^{tm1Eur} mice compared with age-matched controls, as previously reported in the *Ctfr*^{-/-} mice.¹⁶ However, in the study by Haston et al,¹⁶ the median value of serum IGF-1 in 12-week-old *Ctfr*^{-/-} mice was lower (210 ng/mL) compared with the median value of serum IGF-1 of 500 ng/mL that we observed in our 10- and 14-week-old F508del *Ctfr*^{tm1Eur} mice. An alternate explanation for this difference is that no CFTR protein is expressed in the *Ctfr*^{-/-} mouse model, whereas in the F508del *Ctfr*^{tm1Eur} mouse model the F508del mutation in *Ctfr* expresses the F508del CFTR protein similar to the WT protein level. Rogan et al⁴⁰ also reported a significant reduction in serum IGF-1 levels in both newborn *Ctfr*^{-F508} pigs and humans with CF and suggested that the decrease is not only a consequence of malnutrition or pulmonary inflammation, but that loss of CFTR function may have an additional, more direct effect in reducing IGF-1 levels. These data and the present study make it likely that F508del CFTR expression associated with low circu-

lating IGF-1 level might be a causal factor in reduced bone formation. How the F508del mutation in CFTR decreases the serum IGF-1 level remains, to date, to be investigated.

In humans, vitamin D deficiency also results in impaired bone density owing to decreased calcium absorption. Although lower serum 25-hydroxyvitamin D levels commonly are seen in patients with CF compared with the non-CF population, cross-sectional studies have shown no clear association between the vitamin D status and BMD of CF patients.⁵ In addition, vitamin D supplementation shows no evidence of benefits on BMD, fractures, and bone turnover markers in CF individuals.^{8,43} Adequate calcium intake is essential to achieve an optimal peak bone mass. In the present study, we reported a comparable total calcium/phosphate atomic ratio in femoral bone between adult F508del *Ctfr*^{tm1Eur} and control mice, suggesting that bone calcium and phosphate content was not affected in F508del *Ctfr*^{tm1Eur} mice. In support of this contention, Hillman et al⁴⁴ showed that in patients with CF the percentage of true calcium absorption was in the normal range based on age and pubertal state compared with the control population.

Our data generate the hypothesis that the diminished bone mass observed in F508del-CFTR mice may imply an inherent defect of the F508del mutation, leading to a reduction of new bone formation *in vivo* that is not sex- and age-specific. These data are the first to show an important role for CFTR in maintaining bone mass, as well as new bone formation. Most experts in the European CF bone mineralization working group⁸ found that bone loss is observed most often in the peripubertal age range (8 to 10 years) in CF patients. In accordance with these clinical data, we show a marked bone mass loss and altered trabecular bone architecture in F508del *Ctfr*^{tm1Eur} mice at the prepubertal state. Our data support the conclusion that the F508del-CFTR mutation may contribute to bone disease by slowing the new bone formation in infants and young children with cystic fibrosis. Additional molecular and cellular studies are required to elucidate how the F508del mutation in CFTR could disrupt the process of osteogenic differentiation, which could take place in bone marrow stromal cells, to affect both the osteoblastogenesis and osteoclastogenesis processes. The murine F508del *Ctfr*^{tm1Eur} model detailed earlier may become a valuable tool to identify new anabolic targets for the treatment of CF-related bone disease.

Acknowledgments

We thank Marie Françoise Bertrand (CDTA, Orleans, France) for providing Rotterdam FVB *Ctfr*^{tm1Eur} mice (which were developed with the support of EUROCARECF) and Christine Guillaume and Sylvie Bouthors (Equipe EA 4691, Biomateriaux et Inflammation en Site Osseux, SFR CAP-Santé, FED 4231, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France) for their excellent technical assistance.

References

1. Davis PB: Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med* 2006, 173:475-482
2. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC: Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989, 245:1073-1080
3. Rfordan JR: CFTR function and prospects for therapy. *Annu Rev Biochem* 2008, 77:701-726
4. Aris RM, Merkel PA, Bachrach LK, Borowitz DS, Boyle MP, Elkin SL, Gulse TA, Hardin DS, Haworth CS, Holick MF, Joseph PM, O'Brien K, Tullis E, Watts NB, White TB: Guide to bone health and disease in cystic fibrosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2005, 90:1888-1896
5. Haworth CS: Impact of cystic fibrosis on bone health. *Curr Opin Pulm Med* 2010, 16:616-622
6. Bianchi ML, Romano G, Saratello S, Costantini D, Limonta C, Colombo C: BMD and body composition in children and young patients affected by cystic fibrosis. *J Bone Miner Res* 2006, 21:388-396
7. Gore AP, Kwon SH, Slenbit AE: A roadmap to the brittle bones of cystic fibrosis. *J Osteoporos* 2010, 2011:926045
8. Sermet-Gaudelus I, Bianchi ML, Garabedian M, Aris RM, Morton A, Hardin DS, Elkin SL, Compston JE, Conway SP, Castanet M, Wolfe S, Haworth CS: European cystic fibrosis bone mineralisation guidelines. *J Cyst Fibros* 2011, 10(Suppl 2):S16-S23
9. Paccou J, Zeboulon N, Combescure C, Gossec L, Cortet B: The prevalence of osteoporosis, osteopenia, and fractures among adults with cystic fibrosis: a systematic literature review with meta-analysis. *Calcif Tissue Int* 2010, 86:1-7
10. Javier RM, Jacquot J: Bone disease in cystic fibrosis: what's new? *Joint Bone Spine* 2011, 18:445-450
11. Sermet-Gaudelus I, Castanet M, Retsch-Bogart G, Aris RM: Update on cystic fibrosis-related bone disease: a special focus on children. *Paediatr Respir Rev* 2009, 10:134-142
12. Ionescu AA, Nixon LS, Evans WD, Stone MD, Lewis-Jenkins V, Chatham K, Shale DJ: Bone density, body composition, and inflammatory status in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000, 162:789-794
13. Sparks AA, McGee SJ, Boone CE, Neuringer IP, Jones SK, Aris RM: "Old" bones in young bodies: the tale of cystic fibrosis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2009, 16:407-414
14. Bianchi ML: Osteoporosis in children and adolescents. *Bone* 2007, 41:486-495
15. Sermet-Gaudelus I, Souberbielle JC, Rutz JC, Vrielynck S, Heullin B, Azhar I, Cazeneuve A, Lawson-Body E, Chedevergne F, Lenoir G: Low bone mineral density in young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007, 175:951-957
16. Haston CK, Li W, Li A, Laffeur M, Henderson JE: Persistent osteopenia in adult cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2008, 177:309-315
17. Dill F, Marty C, Baudoin C, de Vernejoul MC, Levi G: Severe osteopenia in CFTR-null mice. *Bone* 2004, 35:595-603
18. Pashuck TD, Franz SE, Altman MK, Wasserfall CH, Atkinson MA, Wronski TJ, Holte TR, Stalvey MS: Murine model for cystic fibrosis bone disease demonstrates osteopenia and sex-related differences in bone formation. *Pediatr Res* 2009, 65:311-316
19. Shead EF, Haworth CS, Condliffe AM, McKeon DJ, Scott MA, Compston JE: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) is expressed in human bone. *Thorax* 2007, 62:650-651
20. Le Heron L, Guillaume C, Velard F, Braux J, Touqui L, Moriceau S, Sermet-Gaudelus I, Laurent-Maquin D, Jacquot J: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) regulates the production of osteoprotegerin (OPG) and prostaglandin (PG) E(2) in human bone. *J Cyst Fibros* 2010, 9:69-72
21. Gimenez A, Le Henaff C, Norez C, Guillaume C, Ravoninjaloto B, Laurent-Maquin D, Bacq F, Jacquot J: Deficit of osteoprotegerin release by osteoblasts from a patient with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2012, 39:780-781
22. King SJ, Topliss DJ, Kotsimbos T, Nyulasi IB, Bailey M, Ebeling PR, Wilson JW: Reduced bone density in cystic fibrosis: deltaF508 mutation is an independent risk factor. *Eur Respir J* 2005, 25:54-61
23. van Doorninck JH, French PJ, Verbeek E, Peters RH, Morreau H, Bijman J, Scholte BJ: A mouse model for the cystic fibrosis delta F508 mutation. *EMBO J* 1995, 14:4403-4411
24. Borvin E, Le Rouzic P, Bernaudin JF, Cottart CH, Vandebrouck C, Crie A, Leal T, Clement A, Bonora M: Congenital tracheal malformation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-deficient mice. *J Physiol* 2008, 586:3231-3243
25. Dorozhkin SV, Epple M: Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew Chem Int Ed Engl* 2002, 41:3130-3146
26. Drevet R, Velard F, Poltron S, Laurent-Maquin D, Benhayoune H: In vitro dissolution and corrosion study of calcium phosphate coatings elaborated by pulsed electrodeposition current on Ti6Al4V substrate. *J Mater Sci Mater Med* 2011, 22:753-761
27. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR: Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 1987, 2:595-610
28. Vignery A, Baron R: Dynamic histomorphometry of alveolar bone remodelling in the adult rat. *Anal Rec* 1980, 196:191-200
29. Paradis J, Wilke M, Haston CK: Osteopenia in Cfr-deltaF508 mice. *J Cyst Fibros* 2010, 9:239-245
30. Haworth CS, Selby PL, Webb AK, Dodd ME, Musson H, Mc LNR, Economou G, Horrocks AW, Freemont AJ, Mawer EB, Adams JE: Low bone mineral density in adults with cystic fibrosis. *Thorax* 1999, 54:961-967
31. Elkin SL, Veda S, Bord S, Garrahan NJ, Hodson ME, Compston JE: Histomorphometric analysis of bone biopsies from the iliac crest of adults with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002, 166:1470-1474
32. Haworth CS, Freemont AJ, Webb AK, Dodd ME, Selby PL, Mawer EB, Adams JE: Hip fracture and bone histomorphometry in a young adult with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 1999, 14:478-479
33. Grey V, Atkinson S, Drury D, Casey L, Ferland G, Gundberg C, Lands LC: Prevalence of low bone mass and deficiencies of vitamins D and K in pediatric patients with cystic fibrosis from 3 Canadian centers. *Pediatrics* 2008, 122:1014-1020
34. Aris RM, Stephens AR, Orljes DA, Denene Blackwood A, Lark RK, Hensler MB, Neuringer IP, Lester GE: Adverse alterations in bone metabolism are associated with lung infection in adults with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000, 162:1674-1678
35. Shead EF, Haworth CS, Barker H, Bilton D, Compston JE: Osteoclast function, bone turnover and inflammatory cytokines during infective exacerbations of cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2010, 9:93-98
36. Wilke M, Bujs-Offerman RM, Aarbiou J, Colledge WH, Sheppard DN, Touqui L, Bot A, Jorna H, de Jonge HR, Scholte BJ: Mouse models of cystic fibrosis: phenotypic analysis and research applications. *J Cyst Fibros* 2011, 10(Suppl 2):S152-S171
37. Yakar S, Rosen CJ, Beamer WG, Ackerl-Blicknell CL, Wu Y, Liu JL, Ooi GT, Setser J, Frysyk J, Boisclair YR, LeRoith D: Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *J Clin Invest* 2002, 110:771-781
38. Festini F, Taccetti G, Repetto T, Reali MF, Campana S, Mergni G, Mariani L, de Martino M: Gestational and neonatal characteristics of children with cystic fibrosis: a cohort study. *J Pediatr* 2005, 147:316-320
39. Switzer M, Rice J, Rice M, Hardin DS: Insulin-like growth factor-1 levels predict weight, height and protein catabolism in children and adolescents with cystic fibrosis. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2009, 22:417-424
40. Rogan MP, Reznikov LR, Pezzulo AA, Gansemer ND, Samuel M, Prather RS, Zabner J, Fredericks DC, McCray PB Jr, Welsh MJ, Stoltz DA: Pigs and humans with cystic fibrosis have reduced insulin-like growth factor 1 (IGF1) levels at birth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, 107:20571-20575
41. Rosenberg LA, Schluchter MD, Parlow AF, Drumm ML: Mouse as a model of growth retardation in cystic fibrosis. *Pediatr Res* 2006, 59:191-195
42. Gordon CM, Binello E, LeBoff MS, Wohl ME, Rosen CJ, Collin AA: Relationship between insulin-like growth factor I, dehydroepiandrosterone sulfate and proresorptive cytokines and bone density in cystic fibrosis. *Osteoporos Int* 2006, 17:783-790
43. Haworth CS, Jones AM, Adams JE, Selby PL, Webb AK: Randomised double blind placebo controlled trial investigating the effect of calcium and vitamin D supplementation on bone mineral density and bone metabolism in adult patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2004, 3:233-236
44. Hillman LS, Cassidy JT, Popescu MF, Hewett JE, Kyger J, Robertson JD: Percent true calcium absorption, mineral metabolism, and bone mineralization in children with cystic fibrosis: effect of supplementation with vitamin D and calcium. *Pediatr Pulmonol* 2008, 43:772-780

Dans notre étude, l'évaluation des paramètres osseux a été réalisée sur des souris homozygotes F508del, à 6 semaines (avant la puberté), 10 semaines (puberté) et 14 semaines (jeune adulte). Nous avons réalisé ces analyses à partir de souris F508del mâles et femelles séparément.

Comparativement à des souris normales, les souris F508del ne présentent pas de différence au niveau de la taille des fémurs, quels que soit l'âge et le sexe de la souris. Par contre, elles ont un poids significativement plus bas que leurs contrôles respectifs. Elles ont une activité « sportive », en cage, et une mobilité semblable à leurs contrôles respectives.

Lors de l'analyse de la microarchitecture osseuse par micro CT et par histomorphométrie, nous avons observé, après 6, 10 et 14 semaines de vie chez la souris F508del et dans les 2 sexes :

- Une diminution de la masse osseuse : diminution de la densité minérale osseuse (BMD) du corps total, au niveau du fémur et de manière moins importante, au niveau des vertèbres, des tibias (données non montrées),
- Une altération de l'architecture trabéculaire osseuse avec :
 - o Une diminution du volume osseux,
 - o Une diminution de l'épaisseur des travées osseuses,
 - o Une diminution du nombre de travées osseuses,
 - o Une augmentation de l'espace entre les travées osseuses.
- Une diminution de la formation de l'os trabéculaire avec:
 - o Pas de modification significative du nombre d'ostéoclastes à 6 et 14 semaines,
 - o Une augmentation du nombre d'ostéoclastes à 10 semaines résultant d'un retard de croissance des souris F508del,
 - o Une diminution de l'apposition minérale osseuse trabéculaire provenant d'une diminution de l'activité des ostéoblastes lors de la phase de formation osseuse,
 - o Pas de modification significative du rapport Ca/P induisant une homéostasie osseuse et un statut nutritionnel normal,
 - o Une diminution du taux sérique d'IGF-1,
 - o Pas de modification significative du taux sérique d'ostéocalcine.

Les différences histomorphométriques sont plus marquées à 6 semaines et se réduisent à 14 semaines chez les souris F508del femelles. Par contre, elles restent conservées chez les souris F508del mâles au cours du temps.

Nos résultats montrent clairement que la mutation F508del-CFTR induit une diminution de la masse osseuse et de la formation osseuse, indépendamment du sexe de l'animal. Les souris F508del ne présentant pas d'inflammation, ni d'infection pulmonaire, ni de traitement aux corticoïdes, ni de sédentarité, cela suggère un rôle potentiel direct de la mutation F508del-CFTR dans la perte osseuse.

2. Etude de la production d'ostéoprotégérine par les ostéoblastes primaires humains CF hétérozygote pour la mutation F508del-CFTR

Deficit of osteoprotegerin release by osteoblasts from a patient with cystic fibrosis

Gimenez A, Le Henaff C., Norez C., Guillaume C., Ravoninjatovo B., Laurent-Maquin D., Becq F. and Jacquot J.

Eur Respir J. 2012 Mar;39(3):780-1

REFERENCES

- 1 Rosen SH, Castleman B, Liebow AA. Pulmonary alveolar proteinosis. *N Engl J Med* 1958; 258: 1123–1142.
- 2 Kitamura T, Tanaka N, Watanabe J, *et al.* Idiopathic pulmonary alveolar proteinosis as an autoimmune disease with neutralizing antibody against granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1999; 190: 875–880.
- 3 Seymour JF, Presneill JJ. Pulmonary alveolar proteinosis: progress in the first 44 years. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 215–235.
- 4 Sakagami T, Beck D, Uchida K, *et al.* Patient-derived granulocyte/macrophage colony-stimulating factor autoantibodies reproduce pulmonary alveolar proteinosis in nonhuman primates. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182: 49–61.
- 5 Seymour JF, Presneill JJ, Schoch OD, *et al.* Therapeutic efficacy of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with idiopathic acquired alveolar proteinosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 524–531.
- 6 Venkateshiah SB, Yan TD, Bonfield TL, *et al.* An open-label trial of granulocyte macrophage colony stimulating factor therapy for moderate symptomatic pulmonary alveolar proteinosis. *Chest* 2006; 130: 227–237.
- 7 Tazawa R, Hamano E, Arai T, *et al.* Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and lung immunity in pulmonary alveolar proteinosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 1142–1149.
- 8 Bonfield TL, Kavuru MS, Thomassen MJ. Anti-GM-CSF titer predicts response to GM-CSF therapy in pulmonary alveolar proteinosis. *Clin Immunol* 2002; 105: 342–350.
- 9 Tazawa R, Trapnell BC, Inoue Y, *et al.* Inhaled granulocyte/macrophage-colony stimulating factor as therapy for pulmonary alveolar proteinosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181: 1345–1354.
- 10 Uchida K, Nakata K, Suzuki T, *et al.* Granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor autoantibodies and myeloid cell immune functions in healthy subjects. *Blood* 2009; 113: 2547–2556.
- 11 Bonfield TL, Raychaudhuri B, Malur A, *et al.* PU.1 regulation of human alveolar macrophage differentiation requires granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 285: L1132–L1136.

DOI: 10.1183/09031936.00076711

Deficit of osteoprotegerin release by osteoblasts from a patient with cystic fibrosis

To the Editors:

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive disorder caused by mutations of the CF transmembrane conductance regulator (CFTR), a cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-dependent anion channel expressed mostly in epithelia. Bone deficiency is commonly seen in patients with CF and begins at a young age. Low bone mass affects children and young adults with CF and is associated with significant morbidity due to fractures and decreased lung function. Brittle bones in CF disease have been confirmed by densitometric data, the presence of fractures, and impaired quality of life of young and adult patients [1]. Whether or not this is caused by bone disease around puberty due to a poor acquisition of peak bone mass and worsens with age, lower bone mineral density (BMD) gains are already being observed in CF children with mild disease and normal nutritional status, suggesting that CF-related low BMD may, in part, be due to a primary defect in bone metabolism [2]. In human bone cells, the expression of CFTR protein has been identified by immunohistological observations [3]; we further reported the expression of CFTR mRNA and protein in primary human osteoblasts (the cells of bone formation) [4]. Although there is a report demonstrating a direct association between the F508del mutation and CF-related low BMD in young CF adults with at least one F508del allele [5], the effect of mutations in CFTR, specifically the F508del allele in bone cell metabolism is, to date, unknown.

Since its initial discovery in 1997 as a key regulator in bone density [6], osteoprotegerin (OPG), a product of osteoblasts, is now well known as an inhibitor of osteoclastogenesis. The OPG protein has been shown not only to inhibit osteoclast-mediated bone resorption, but also to exert direct osteoanabolic effects by increasing alkaline phosphatase activity and mineralisation in human osteoblasts [7]. To our knowledge, it is not known

whether the F508del mutation in CFTR has a direct effect on human osteoblast activity.

Here, we report, for the first time, both defective CFTR-mediated chloride channel activity and a severe deficit of OPG protein release by osteoblasts of a 25-yr-old CF male with the F508del/G542X mutation in CFTR. The CFTR-mediated chloride channel activity and the level of OPG release were investigated in primary osteoblasts cultured from fresh ankle bone fragments from the CF patient. Normal human osteoblasts, used as controls, were obtained from fresh bone fragments of healthy young adults who underwent trauma surgery. All CF and normal primary osteoblast cell culture (used at the second to third passage and after confluence within 6–8 weeks) was performed as previously described [4]. The bone samples were obtained with informed patient consent after approval by the local research ethics committee (Faculty of Medicine, Reims, France).

First, to test the chloride channel activities in primary human osteoblasts, functional analysis was performed by measuring the cAMP-regulated and CFTR-dependent iodide efflux in the presence of a mixture composed of forskolin (an adenylate cyclase activator raising the cellular cAMP level) and genistein (a direct activator of CFTR), as previously described [8]. As shown in figure 1a, a total absence of CFTR-dependent chloride response in F508del-CFTR osteoblasts was observed compared with normal osteoblasts. Interestingly, the two calcium-dependent and volume-dependent chloride channels were found to be fully functional in both F508del-CFTR and normal osteoblasts. Secondly, we demonstrated that the level of both basal and stimulated (tumour necrosis factor- α , 20 ng·mL⁻¹ for 4 h) release of OPG protein (evaluated by ELISA) in F508del-CFTR osteoblast cultures was approximately 8–10% of that observed in normal osteoblasts (fig. 1b).

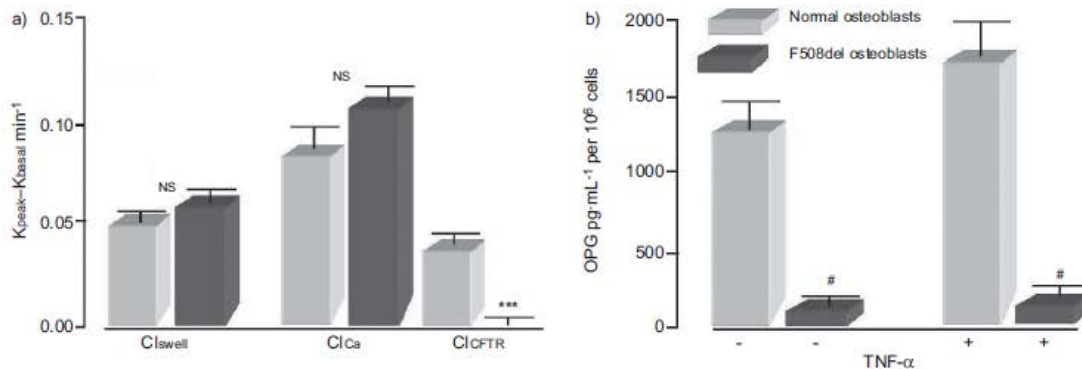


FIGURE 1. a) Chloride channel activities in F508del cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and normal primary human osteoblasts. CFTR-dependent (Cl_{CFTR}), calcium-dependent (Cl_{Ca}) and volume-dependent (Cl_{well}) chloride channels were stimulated with a mixture of forskolin (10 μM) and genistein (30 μM), by the calcium ionophore A23187 (1 μM) and by a hypo-osmotic challenge, respectively. n=4. b) Level of osteoprotegerin (OPG) protein release by cultured F508del-CFTR and normal primary human osteoblasts maintained for a 4-h period in the absence (-) and presence (+) of tumour necrosis factor (TNF)-α (20 ng·mL⁻¹). n=3. Data are presented as mean ± SEM. NS: nonsignificant. #: p<0.005 compared with normal osteoblasts. ***: p<0.001 compared with normal osteoblasts.

The cause of the CF-related low BMD is multifactorial, including vitamin K and D insufficiency, calcium malabsorption, malnutrition, glucocorticoid use, delayed puberty, and pulmonary infection/systemic inflammation [1]. Whether CFTR activity plays a direct role in BMD is unknown, but this has been hypothesised on the basis of animal studies with the CFTR-null mouse. Smaller bones with decreased BMD were found in CFTR^{-/-} mice, despite no difference in osteoblast and osteoclast numbers, suggesting that CFTR protein may influence bone cell activity rather than number [9].

In young adults with CF, levels of serum OPG were found to be significantly lower when compared with those of normal controls [10]. Our discovery that there is both a defective CFTR-mediated chloride activity and a severe deficit of OPG release by F508del-CFTR osteoblasts increases the interest in the possible role of the CFTR gene in bone development and pathophysiological processes. The severe deficit of OPG secretion may explain, in part, the low BMD and enhanced bone resorptive activity reported in children and young adults with the F508del mutation [2, 5, 10]. If the key regulatory cascade for OPG production and release can be elucidated, it can open the door for a new therapy for CF-related bone disease by means of controlling OPG production.

A. Gimenez-Maitre*, C. Le Henaff*, C. Norez[§], C. Guillaume*, B. Ravoninjatovo[§], D. Laurent-Maquin*, F. Becq[#] and J. Jacquot*

*Inserm UMR-S 926, IFR 53, Faculté de Médecine, [§]Service des Maladies Respiratoires, CHU de Reims, Reims, and [#]Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires, Université de Poitiers, CNRS, Poitiers, France.

Correspondence: J. Jacquot, Inserm UMR-S 926, Faculté de Médecine, IFR 53, 1 rue du Maréchal Juin, 51095 Reims, France. E-mail: jacky.jacquot@inserm.fr

Support Statement: This study was supported by research grants from the French Association Vaincre la Mucoviscidose and the Region Champagne Ardenne, France.

Statement of Interest: None declared.

REFERENCES

- Haworth CS. Impact of cystic fibrosis on bone health. *Curr Opin Pulm Med* 2010; 16: 616–622.
- Sermet-Gaudelus I, Castanet M, Retsch-Bogart G, et al. Update on cystic fibrosis-related bone disease: a special focus on children. *Paediatr Respir Rev* 2009; 10: 134–142.
- Shead EF, Haworth CS, Condliffe AM, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) is expressed in human bone. *Thorax* 2007; 62: 650–651.
- Le Heron L, Guillaume C, Velard F, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) regulates the production of osteoprotegerin (OPG) and prostaglandin (PG) E(2) in human bone. *J Cyst Fibros* 2010; 9: 69–72.
- King SJ, Topliss DJ, Kotsimbos T, et al. Reduced bone density in cystic fibrosis: ΔF508 mutation is an independent risk factor. *Eur Respir J* 2005; 25: 54–61.
- 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.
- Grundt A, Grafé IA, Liegibel U, et al. Direct effects of osteoprotegerin on human bone cell metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 389: 550–555.
- Norez C, Antigny F, Noel S, et al. A cystic fibrosis respiratory epithelial cell chronically treated by miglustat acquires a non-cystic fibrosis-like phenotype. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009; 41: 217–225.
- Haston CK, Li W, Li A, et al. Persistent osteopenia in adult cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 309–315.
- Shead EF, Haworth CS, Barker H, et al. Osteoclast function, bone turnover and inflammatory cytokines during infective exacerbations of cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2010; 9: 93–98.

DOI: 10.1183/09031936.00104111

Les cellules osseuses humaines CF utilisées sont des ostéoblastes issus d'une culture primaire à partir d'une biopsie osseuse réalisée au niveau de la cheville d'un patient mâle CF, âgé de 25 ans. Ce patient est hétérozygote pour la mutation F508del-CFTR (F508del/G542X). Les cellules osseuses normales proviennent d'un sujet sain ayant eu une intervention chirurgicale à la suite d'un traumatisme.

Dans notre article, plusieurs résultats ont montré des effets de la mutation F508del-CFTR sur l'activité ostéoblastique. Premièrement, les cellules ostéoblastiques normales humaines ont un flux chlorure dépendant du canal CFTR. Par contre, pour les ostéoblastes humains CF, hétérozygotes pour la mutation F508del-CFTR, le flux chlorure dépendant du canal CFTR est pratiquement nul. De manière intéressante, les flux chlorures provenant d'autres canaux chlorures tels que les canaux dépendants du calcium et les canaux dépendants du volume sont présents de manière similaire dans les ostéoblastes CF et les ostéoblastes normaux.

Les ostéoblastes produisent de l'ostéoprotégérine (OPG) à leur niveau basal mais aussi après une stimulation de 4h, par le TNF- α . Par contre, les ostéoblastes CF ne sécrètent qu'environ 10% d'OPG par rapport aux ostéoblastes normaux. Ce taux n'est pas modifié par la stimulation au TNF- α .

Nos données montrent que la mutation F508del-CFTR modifie l'activité ostéoblastique en réduisant la production d'OPG.

3. Etude de la production d'ostéoprotégérine par les ostéoblastes primaires humains homozygote pour la mutation F508del-CFTR

Cystic fibrosis – related bone disease : Low osteoprotegerin production in primary osteoblasts from a cystic fibrosis patient with the homozygote F508del-CFTR mutation

Le Henaff C, Tabary O., Velard F., Barthe F., Sermet-Gaudelus I. and Jacquot J.

Soumis pour publication

Cystic fibrosis - related bone disease: Low osteoprotegerin production in osteoblasts from a young cystic fibrosis patient with the homozygote F508del-CFTR mutation

CAROLE LE HENAFF, OLIVIER TABARY, FRÉDÉRIC VELARD, FRANÇOISE BARTHES, ISABELLE SERMET-GAUDELUS AND JACKY JACQUOT.

CAROLE LE HENAFF, Ph.D.

FREDERIC VELARD, Ph.D.

JACKY JACQUOT, Ph.D.

EA 4691 « Biomatériaux et Inflammation en site osseux »

SFR CAP-Santé (FED 4231),

Université Reims Champagne Ardenne,

51095, Reims, France.

OLIVIER TABARY, Ph.D.

Inserm U938, Hospital St-Antoine,

Bâtiment Kourilsky, 34, rue Crozatier,

75012, Paris, France

FRANCOISE BARTHES, M.D., Ph.D.

Thoracic Surgery Department,

Hôpital Européen Georges Pompidou,

20-40, rue Leblanc,

75015, Paris, France

ISABELLE SERMET-GAUDELUS, M.D., Ph.D.

Pôle de Pédiatrie Multidisciplinaire,

Hôpital Necker, Université René Descartes,

75015, Paris, France

Author Contributions: The manuscript was written by C.L.H. supervised by J.J. The project was designed and supervised by J.J. I.S.G. and F.B supervised the collect of CF patient bone fragment. C.L.H. and F.V. conducted primary osteoblast cultures and biochemical experiments. O.T. performed iodide efflux assays. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

Supported in part by research grants from the French Cystic Fibrosis Association “Vaincre la Mucoviscidose” (RF20110600482 and RF20120600625) and the Region Champagne Ardenne (convention D200911226) to J. J.

To the editor:

Cystic fibrosis (CF) is a lethal autosomal recessive disorder caused by the dysfunction of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) chloride (Cl⁻) channel activity resulting from mutations (1). Brittle bones are commonly seen in patients with CF and begins at a young age. Low bone mass affects children and young adults with CF and is associated with significant morbidity due to fractures and decreased lung function (2). The cause of the CF-related bone disease is multifactorial including vitamin K and D insufficiency, calcium malabsorption, malnutrition, glucocorticoid use, delayed puberty and pulmonary infection/systemic inflammation (3). Whether this is raised with bone disease around puberty due to a poor acquisition of peak bone mass and worsens with age, lower bone mass gains are already being observed in CF children with mild disease and normal nutritional status, suggesting that CF-related bone disease may, in part be due to a primary defect in bone metabolism (4). In human bone cells, the expression of CFTR protein has been identified by immunohistological observations (5); we recently reported the expression of CFTR mRNA and protein in primary human osteoblasts (the cell of bone formation) and showed a low trabecular bone mass in young CF mice with the homozygous F508del-CFTR mutation by reducing bone formation (6, 7). F508del is the most common CFTR mutation, with more than 90% of patients with CF carrying it on at least one allele. Although there is a report demonstrating a direct association between the F508del mutation and low bone density in young CF adults with at least one F508del

allele (8), the effect of the homozygous F508del-CFTR mutation in bone cell metabolism is, to date, unknown.

The osteoprotegerin (OPG), a secreted cytokine receptor of osteoblasts, is a key regulator in bone density which favour bone formation and inhibit bone resorption (9). In young adults with CF, levels of serum OPG were found significantly lower when compared to normal controls (10). Estrogens exert osteoprotective actions by stimulating OPG expression in human osteoblasts (11) and play a significant role in skeletal maintenance in both sexes (12). A positive relationship was found between prevalent vertebral fractures and low serum 17- β estradiol (E_2) level in CF patients in both genders (13). Interestingly, both the CF mouse models with the 489X and F508del mutation in CFTR had higher follicular stimulating hormone levels, suggesting a possible lower serum E_2 level (14). These results prompted us to test the hypothesis that homozygous F508del-CFTR mutation in human osteoblasts might cause a decrease in their OPG production.

We presented a clinical case of a 20-year-old CF male with CF homozygous for the F508del-CFTR mutation undergoing lung transplantation. Primary F508-CFTR osteoblasts were cultured from freshly breastbone fragments of the CF patient. We characterized the CFTR-mediated Cl^- channel activity and the basal and stimulated-OPG secretion of F508-CFTR osteoblasts in the presence and absence of E_2 and pro-inflammatory cytokine TNF- α . Normal human osteoblasts used as control, were obtained from freshly bone fragments of healthy young adults who underwent trauma surgery. All CF and normal primary osteoblast cell cultures (used at the second-third passage and after confluence within 6-8 weeks) were performed as previously described (6). The bone samples were obtained with informed patients consent after approval by the local research ethics committee.

As shown in the Figure 1A, primary F508del-CFTR osteoblasts released less OPG (up to a 10-fold decrease) than normal osteoblasts. After an exposure to a physiological concentration (10 nM) of E_2 for a 48 hour-period, both F508del-CFTR and normal osteoblasts increased their OPG secretion. However, the simultaneously addition of 20 ng/ml TNF- α with E_2 abolished the increase of OPG release in E_2 -treated F508del-CFTR osteoblasts, but not in E_2 -treated normal osteoblasts (Figure 1A). We also demonstrated a CFTR-dependent functional conductance in primary normal osteoblasts, which was markedly reduced in F508del-CFTR osteoblasts (Figure 1B). The exposure of F508del-CFTR osteoblasts to 10 nM of E_2 for 48 hours restored the F508del-CFTR chloride transport which was near to a 50% value of CFTR chloride transport found in normal osteoblasts (Figure 1B), as previously reported for the increased F508del-CFTR chloride transport in human cystic fibrosis airway CFBE14o- cells when exposed to E_2 (15).

Our discovery showing that F508del-CFTR osteoblasts produces lower OPG production, and low levels of circulating estrogen and elevated TNF- α levels that have been reported in CF patients might be a causal factor in reduced bone formation and the prevalence of vertebral fractures. If the key cascade for dysregulated OPG production and release in F508del-CFTR osteoblasts can be elucidated, it can open the door for a new therapy for CF-related bone disease by means of controlling OPG production.

References

1. Welsh, M. J., and A. E. Smith. 1993. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 73(7):1251-4.
2. Aris, R. M., P. A. Merkel, L. K. Bachrach, D. S. Borowitz, M. P. Boyle, S. L. Elkin, T. A. Guise, D. S. Hardin, C. S. Haworth, M. F. Holick, P. M. Joseph, K. O'Brien, E. Tullis, N. B. Watts, and T. B. White. 2005. Guide to bone health and disease in cystic fibrosis. *J Clin Endocrinol Metab* 90(3):1888-96.
3. Haworth, C. S. 2010. Impact of cystic fibrosis on bone health. *Curr Opin Pulm Med* 16(6):616-22.
4. Sermet-Gaudelus, I., J. C. Souberbielle, J. C. Ruiz, S. Vrielynck, B. Heuillon, I. Azhar, A. Cazenave, E. Lawson-Body, F. Chedevergne, and G. Lenoir. 2007. Low bone mineral density in young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 175(9):951-7.
5. Shead, E. F., C. S. Haworth, A. M. Condliffe, D. J. McKeon, M. A. Scott, and J. E. Compston. 2007. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) is expressed in human bone. *Thorax* 62(7):650-1.
6. Le Heron, L., C. Guillaume, F. Velard, J. Braux, L. Touqui, S. Moriceau, I. Sermet-Gaudelus, D. Laurent-Maquin, and J. Jacquot. 2010. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) regulates the production of osteoprotegerin (OPG) and prostaglandin (PG) E(2) in human bone. *J Cyst Fibros* 9(1):69-72.
7. Le Henaff, C., A. Gimenez, E. Hay, C. Marty, P. Marie, and J. Jacquot. 2012. The F508del mutation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene impacts bone formation. *Am J Pathol* 180(5):2068-75.
8. King, S. J., D. J. Topliss, T. Kotsimbos, I. B. Nyulasi, M. Bailey, P. R. Ebeling, and J. W. Wilson. 2005. Reduced bone density in cystic fibrosis: DeltaF508 mutation is an independent risk factor. *Eur Respir J* 25(1):54-61.
9. 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, G. Shimamoto, M. DeRose, R. Elliott, A. Colombero, H. L. Tan, G. Trail, J. Sullivan, E. Davy, N. Bucay, L. Renshaw-Gegg, T. M. Hughes, D. Hill, W. Pattison, P. Campbell, S.

- Sander, G. Van, J. Tarpley, P. Derby, R. Lee, and W. J. Boyle. 1997. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89(2):309-19.
10. Shead, E. F., C. S. Haworth, H. Barker, D. Bilton, and J. E. Compston. 2010. Osteoclast function, bone turnover and inflammatory cytokines during infective exacerbations of cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 9(2):93-8.
 11. Bord, S., D. C. Ireland, S. R. Beavan, and J. E. Compston. 2003. The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts. *Bone* 32(2):136-41.
 12. Imai, Y., S. Kondoh, A. Kouzmenko, and S. Kato. 2011. Minireview: osteoprotective action of estrogens is mediated by osteoclastic estrogen receptor-alpha. *Mol Endocrinol* 24(5):877-85.
 13. Rossini, M., A. Del Marco, F. Dal Santo, D. Gatti, C. Braggion, G. James, and S. Adami. 2004. Prevalence and correlates of vertebral fractures in adults with cystic fibrosis. *Bone* 35(3):771-6.
 14. Chen, H., J. H. Guo, Y. C. Lu, G. L. Ding, M. K. Yu, L. L. Tsang, K. L. Fok, X. M. Liu, X. H. Zhang, Y. W. Chung, P. Huang, H. Huang, and H. C. Chan. 2012. Impaired CFTR-dependent amplification of FSH-stimulated estrogen production in cystic fibrosis and PCOS. *J Clin Endocrinol Metab* 97(3):923-32.
 15. Fanelli, T., R. A. Cardone, M. Favia, L. Guerra, M. Zaccolo, S. Monterisi, T. De Santis, S. M. Riccardi, S. J. Reshkin, and V. Casavola. 2008. Beta-oestradiol rescues DeltaF508CFTR functional expression in human cystic fibrosis airway CFBE41o- cells through the up-regulation of NHERF1. *Biol Cell* 100(7):399-412.

Figure legend:

Figure 1: F508del-CFTR osteoblasts release low OPG level and associates with a defective CFTR-mediated Cl^- channel activity in a 20-year-old CF male with CF homozygous for the F508del-CFTR mutation. (A) Level of OPG protein release by cultured F508del-CFTR and normal primary human osteoblasts maintained for a 48 hour-period in the absence (-) and presence (+) of 10 nM 17- β estradiol (E_2) and TNF- α (20 ng/ml). Data (ELISA assays) are the mean \pm S.E.M of three independent experiments (realized in triplicate). (B) The CFTR-dependent chloride transport was assessed by I^- quenching of halide-sensitive YFP-H148Q/I152L protein. Cells were transfected by a baculovirus containing the YFP-H148Q/I152L plasmid. After 48 hours of culture, CFTR-dependent chloride conductance was stimulated with a mixture composed of forskolin, 3-isobutyl-1-methylxanthine and apigenin (each component at a concentration of 10 μM). To investigate the effect of E_2 exposure on the F508del-CFTR chloride transport, F508del-CFTR osteoblast cultures were pre-incubated to 10 nM of E_2 for 48 hours. Cell wells (F508del osteoblasts, F508del osteoblasts + 17- β estradiol and (control) normal osteoblasts) were then assayed individually for CFTR-mediated I^- influx by addition of 50 μl of a 140 mM I^- solution and recording fluorescence continuously (400 msec/point, Ft) for a 96 sec-period (base line, F0). The decrease in the percentage of Ft/F0 represents the increase of F508del-CFTR chloride conductance. Iodine rather than chloride is used because of strong YFP-H148Q/I152L quenching by iodine, and CFTR protein is also permeable to iodine.

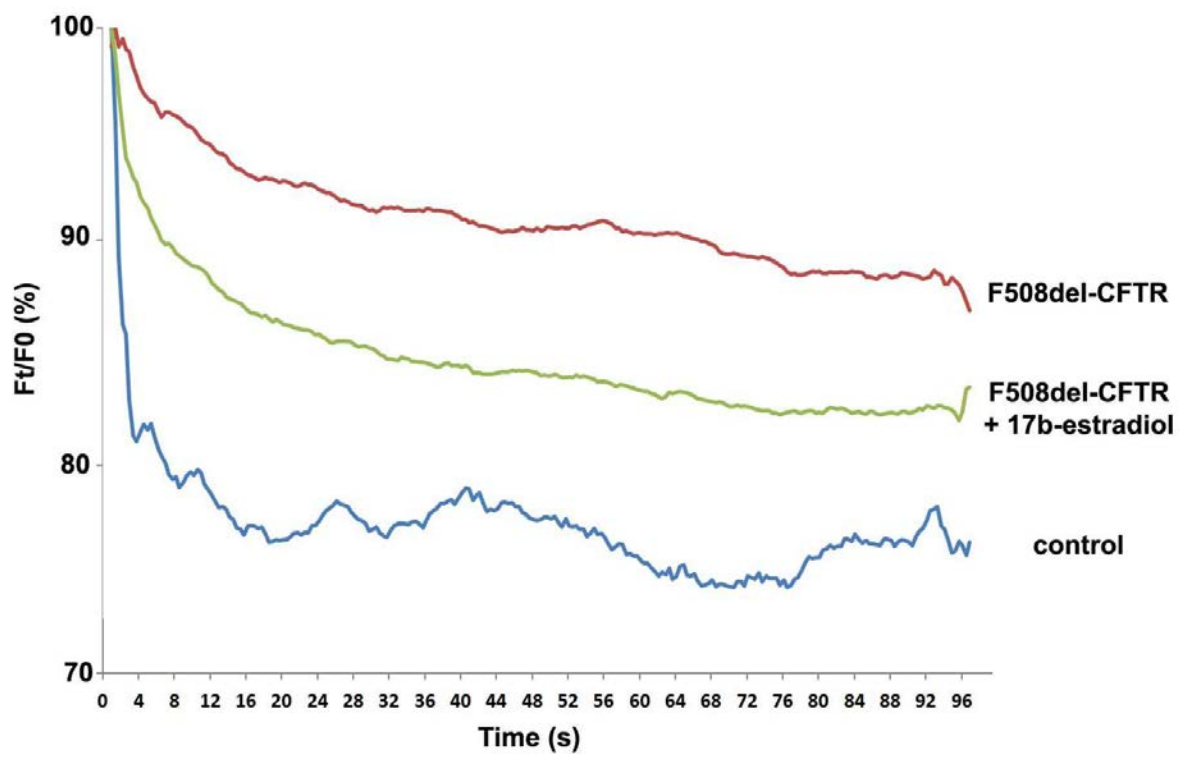
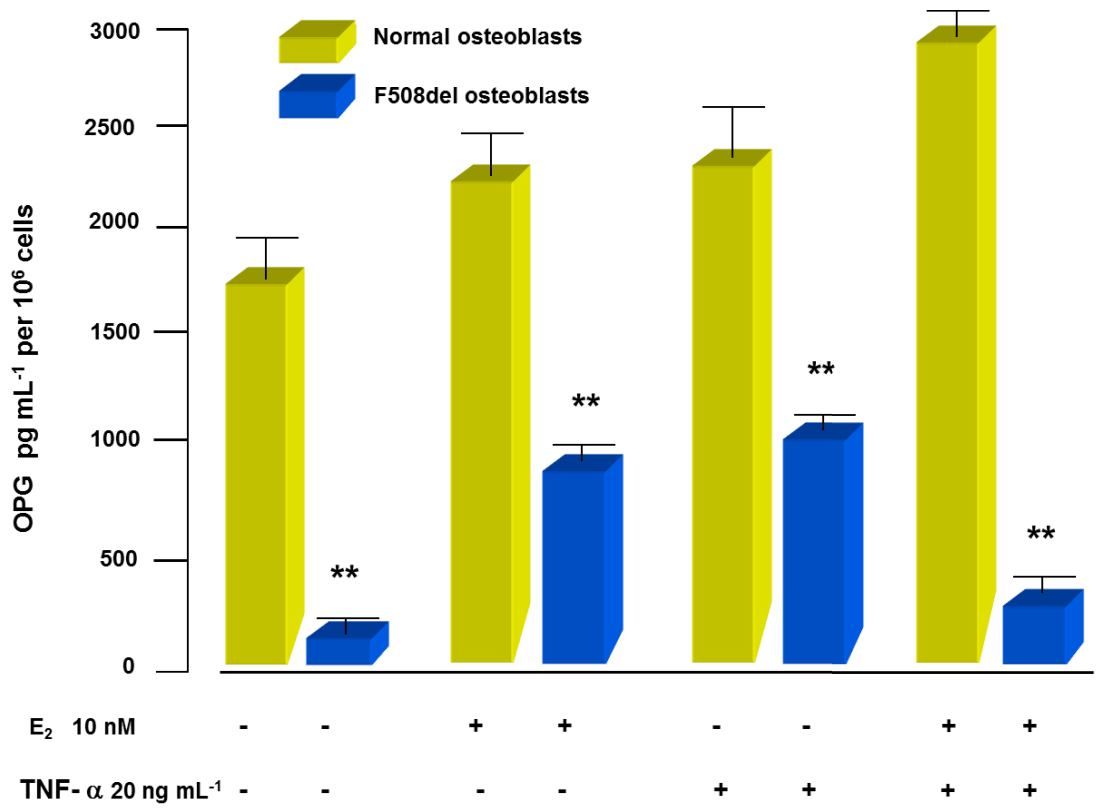


Figure 1

Dans cette étude, les cellules osseuses humaines CF utilisées sont des ostéoblastes issus d'une culture primaire à partir d'une biopsie osseuse, réalisée au niveau des côtes d'un patient CF, âgé de 20 ans lors d'une transplantation de poumons. Ce patient est homozygote pour la mutation F508del-CFTR. Les cellules contrôles proviennent de sujet sain ayant eu une intervention chirurgicale à la suite d'un traumatisme.

Comme précédemment, les ostéoblastes normaux sécrètent de l'OPG à l'état basal. Cette sécrétion est légèrement augmentée après une stimulation de 4h par le TNF- α (20 ng/mL) ou de 24h par l'œstradiol (10nM). Une co-stimulation par le TNF- α et l'œstradiol induit une augmentation plus importante du taux d'OPG dans le milieu cellulaire. Par contre, pour des ostéoblastes CF, la sécrétion d'OPG est fortement réduite que ce soit au niveau basal mais aussi après une stimulation au 17 β -œstradiol combinée au TNF- α . Cette inhibition est moins importante en présence du 17 β -œstradiol seul ou de TNF- α seul.

Les ostéoblastes normaux présentent un flux d'ions chlorures sortant dépendant du canal CFTR, alors que ce flux est quasiment nul, au niveau des ostéoblastes homozygotes pour la mutation F508del-CFTR. L'addition du 17 β -œstradiol permet une restauration partielle (de plus de 50% environ) de ce flux chlorure dans les ostéoblastes CF, ayant la mutation homozygote F508del-CFTR.

II. Le miglustat a un effet bénéfique sur la masse et la formation osseuse dans le modèle murin F508del

A. Etat des lieux

Dans le premier article, nous avons démontré que des souris homozygotes F508del, jeunes et adultes, présentent une sévère ostéopénie dans les 2 sexes (Le Henaff *et al.*, 2012). Chez l'homme, la protéine CFTR est exprimée dans les cellules osseuses (observée par immunohistochimie sur des coupes histologiques humaines ; Shead *et al.*, 2007) et également détectée à partir de cultures primaires d'ostéoblastes humains (Bronckers *et al.*, 2010 ; Le Heron *et al.*, 2010). Nous avons montré dans des études précédentes que la mutation F508del-CFTR, modifie l'activité de l'ostéoblaste primaire humain (Gimenez-Maitre *et al.*, 2011).

Chez les patients CF, des essais cliniques sont en cours pour évaluer des traitements potentiels de la maladie osseuse induite par la mucoviscidose. Aujourd'hui, ce sont plutôt des traitements préventifs contre la diminution de la densité minérale osseuse. Cela nécessite la prise en charge de tous les aspects de la maladie, notamment le maintien d'une bonne fonction respiratoire, digestive, hormonale et une activité physique régulière (Sermet-Gaudelus *et al.*, 2007 ; Gore *et al.*, 2010 ; Javier and Jacquot, 2011 ; Sermet-Gaudelus *et al.*, 2011).

Parmi les molécules utilisées ou en cours d'essai clinique, le miglustat a été approuvé par la FDA pour le traitement de la maladie de Gaucher (Cox *et al.*, 2000 ; Elstein *et al.*, 2004 ; Pastores *et al.*, 2007 ; Venier and Igdoura, 2012), des infections virales (Jacob *et al.*, 2007 ; Lubamba *et al.*, 2012). Très récemment dans la mucoviscidose, une normalisation du transport des ions chlorures a été observée après une application du miglustat au niveau de la muqueuse nasale des souris F508del (Lubamba *et al.*, 2009). De plus, le miglustat a été récemment évalué sur 11 patients CF homozygotes pour la mutation F508del-CFTR (Leonard *et al.*, 2012). Dans cette étude, aucun effet significatif du miglustat n'a été observé sur la différence de potentiel nasal. D'autres études sont nécessaires afin de confirmer, ou non, ce résultat en augmentant le nombre de patients CF et/ou en allongeant la durée du traitement (Jenkins and Glenn, 2012).

Dans nos travaux, nous avons testé le miglustat en l'administrant, par gavage, à des souris homozygotes pour la mutation F508del-CFTR mâles de 6 semaines de manière journalière, pendant 4 semaines. Puis, une fois le traitement terminé, nous avons analysé les effets du miglustat sur les altérations de la formation osseuse et de la microarchitecture osseuse.

B. Résultats préliminaires

Nous avons traité des souris F508del mâles avec du Miglustat (obtenu des laboratoires Actelion, Suisse). Le traitement est quotidien et est effectué par gavage (120mg/kg/jour de miglustat, dilution dans du PBS) pendant 4 semaines à des souris F508del âgées de 6 semaines. Les souris ont été sacrifiées à 10 semaines. Les effets du miglustat sur le poids et le phénotype osseux de la souris F508del mâle ont été évalués

Pour cela, nous avons créé 3 groupes de souris :

- Groupe 1 : 3 souris mâles F508del traitées au miglustat (120mg/Kg/jour)
- Groupe 2 : 4 souris mâles F508del traitées au PBS (groupe contrôle de 1)
- Groupe 3 : 5 souris mâles sauvage traitées au PBS (groupe contrôle de 2)

1) Les souris F508del traitées au miglustat ont une architecture osseuse améliorée au niveau de l'os trabéculaire.

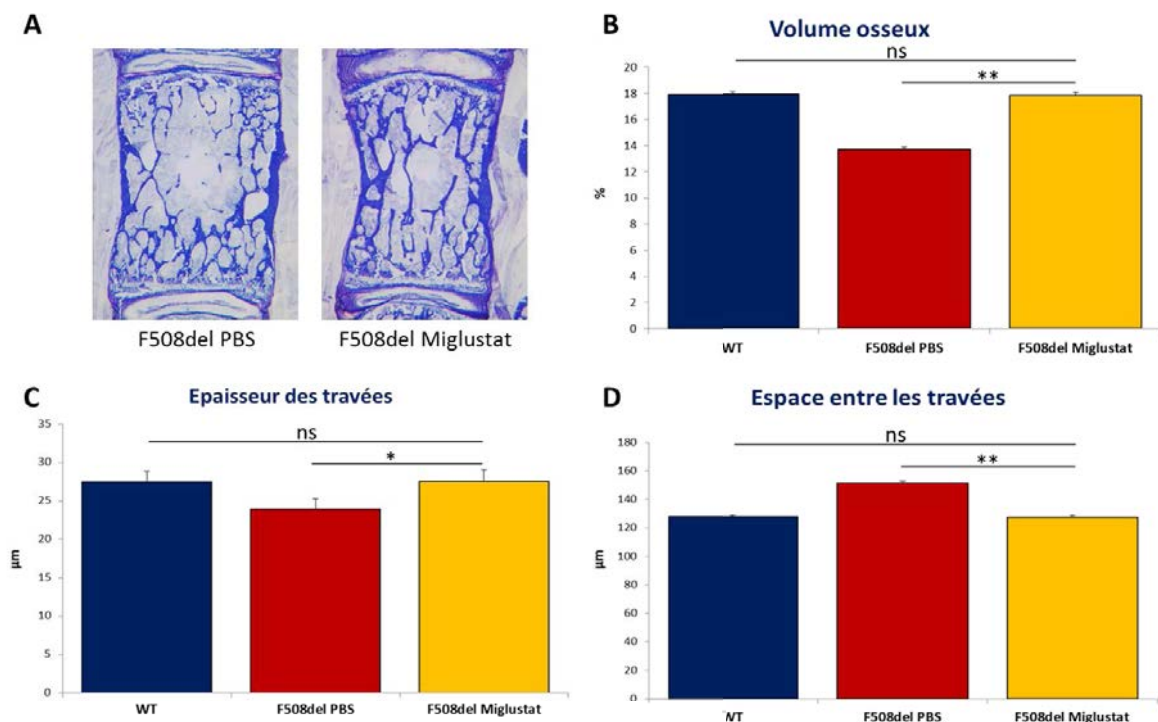


Figure 3 : Analyses des paramètres histomorphométriques au niveau du rachis

Comparativement à des souris F508del traitées au PBS, nous observons une nette augmentation du volume osseux (+30%, figure 3B) au niveau de l'os trabéculaire vertébral (figure 3A) chez les souris F508del traitées au miglustat et tend à se rapprocher de celui des souris sauvages. Après l'analyse des travées, nous avons observé que les souris F508del traitées au miglustat présentent une augmentation de l'épaisseur des travées (+15%, figure 3C) et une

diminution de l'espace entre les travées (-16%, figure 3D) par rapport aux souris F508del non traitées. Cette augmentation nette du volume osseux et de l'épaisseur des travées, liée au traitement par le miglustat induit un phénotype proche des souris sauvage au niveau des vertèbres.

A la surprise des résultats au niveau des vertèbres, d'une normalisation du volume osseux, on a voulu voir ce qu'il en était au niveau du fémur.

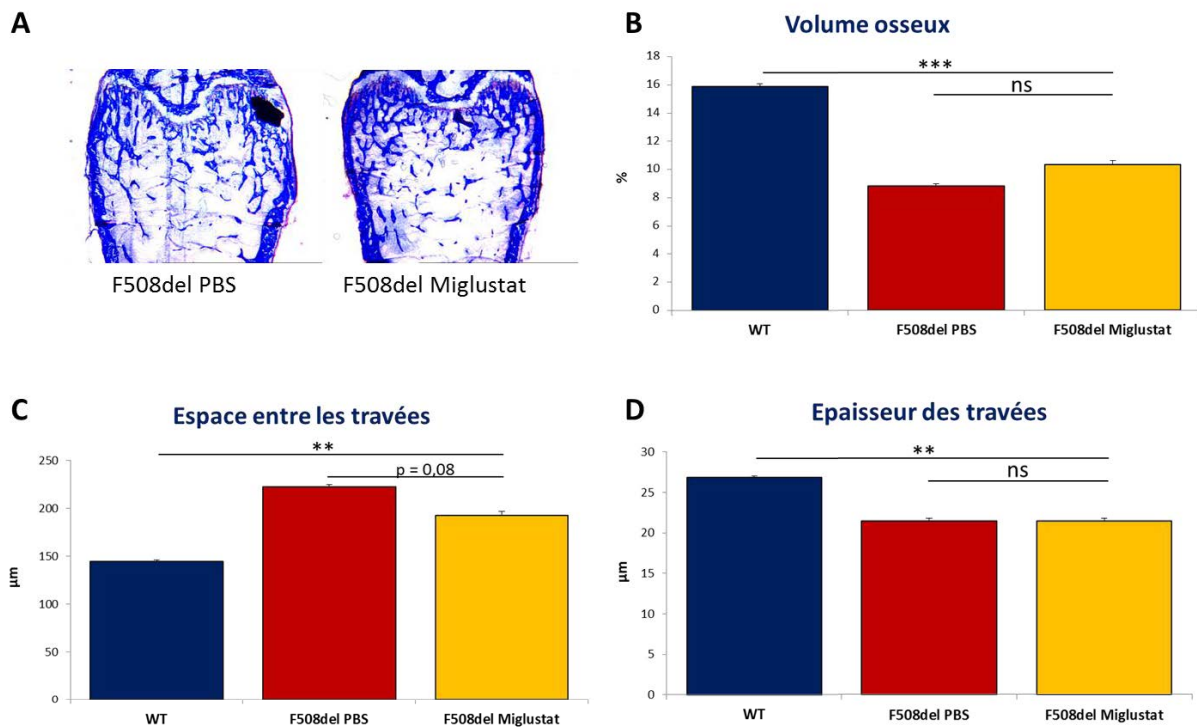


Figure 4 : Analyses des paramètres histomorphométriques au niveau du fémur

Le volume osseux, au niveau du fémur (figure 4A), tend à être légèrement augmenté chez les souris F508del traitées au miglustat (+17%) par rapport à leur contrôle (figure 4B). L'espace entre les travées tend à être diminué chez les souris F508del traitées au miglustat (-13%) par rapport aux souris F508del contrôles (figure 4C). Après l'analyse de l'épaisseur des travées, nous avons observé que les souris F508del traitées au miglustat ne présentent pas de modification au niveau de l'épaisseur des travées (+0.2%) par rapport aux souris F508del traitées au PBS (figure 4D).

2) Conclusions préliminaires.

Nos premiers résultats, après un traitement de seulement 4 semaines, ont permis de montrer une nette augmentation de l'os trabéculaire vertébral, chez les 3 souris F508del traitées tendant vers un phénotype osseux observé chez les souris sauvages. L'effet du miglustat a été moins notable sur le fémur avec une augmentation plus légère du volume osseux. Une augmentation du nombre de souris traitées au miglustat pourrait nous permettre d'affirmer cette augmentation de la masse osseuse au niveau des vertèbres.

C. Résultats

Ces résultats obtenus lors de de mon travail de thèse fera l'objet d'une publication :

Increase of bone mass by miglustat : support for the use of miglustat therapy in cystic fibrosis.

Le Henaff C, Haÿ E, Velard F, Marty C, Morand O, Marie P, Jacquot J.

Manuscrit en cours d'écriture

Increase of bone mass by miglustat: Support for the use of miglustat therapy in cystic fibrosis bone disease

**Carole Le Henaff¹, Eric Haÿ², Frédéric Velard¹, Caroline Marty², Olivier Morand³,
Pierre J. Marie² and Jacky P. Jacquot¹.**

¹EA 4691 « Biomatériaux et Inflammation en site osseux » SFR CAP-Santé (FED 4231),
Université Reims Champagne Ardenne, 51095, Reims, France.

²Laboratory of Osteoblast Biology and Pathology, Inserm UMR-606, University Paris Diderot, 75475,
Paris cedex 10, France.

³Actelion Pharmaceuticals Ltd, Gewerbestrasse 16, CH-4123 Allshwil, Switzerland.

Running title: Miglustat in CF-related bone disease

Correspondence author: Jacky Jacquot, PhD, EA 4691 « Biomatériaux et Inflammation en site osseux » SFR CAP-Santé (FED 4231), Université Reims Champagne Ardenne,
1, rue du Maréchal Juin, 51095, Reims, France.

Tel.: 00 33 326 918 641

Fax : 00 33 326 918 267

E-mail: jacky.jacquot@inserm.fr

Grants: Preparation of this article was supported in part by grants from the French Association Vaincre La Mucoviscidose (RF20110600482 and RF20120600625), Paris, an Inserm/Région Champagne-Ardenne Research Program (convention D200911226), Reims, France and Inserm, Paris, France.

Conflict of interest statement: None of the authors has a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of the presented manuscript.

Listing of contributions: Conception: CLH, PJM & JJ; analysis and interpretation of experimental results: CLH, EH, FV, CM, OM, PJM & JJ; drafting of manuscript: CLH, FV, PJM & JJ.

Key words: cystic fibrosis, bone disease, miglustat, F508del-CFTR mice.

Manuscript character count: XXXXX

This article has an online supplement, which is accessible from this issue's table of content online at www.atsjournals.org.

At a Glance Commentary:

Scientific Knowledge on the Subject - Airway delivery of miglustat has been shown to normalize nasal potential difference in F508del cystic fibrosis mice.

What This Study Adds to the Field - Oral administration of miglustat normalizes bone mass and ameliorated bone microarchitecture in F508del cystic fibrosis mice. This study strongly suggests for the use of miglustat therapy in patient with cystic fibrosis related bone disease.

Abstract

Rationale: Mice with the F508del mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*Cftr*) gene develop a severe osteopenic phenotype. N-butyldeoxynojirimycin (NB-DNJ, miglustat [Zavesca]) an approved drug for treating bone pathology in type I Gaucher disease, was reported to normalize sodium and CFTR-dependent chloride transport in nasal mucosa of F508del cystic fibrosis mice.

Objectives: To evaluate the efficacy of *in vivo* miglustat for restoring bone mass in cystic fibrosis.

Methods: The bone microarchitecture of F508del mice, relative to wild type (WT) littermates was evaluated after an administration of 120 mg/kg/day miglustat by oral gavage for 28 days using *in vivo* micro-CT, bone histomorphometry, and analysis of dynamic parameters of bone formation. Levels of serum insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and 17 β -estradiol (E₂) were also determined.

Measurements and Main results: Once-day treatments with miglustat, over 4 weeks, normalized trabecular bone volume of the lumbar spine in F508del mice. This increase of bone volume was related to both an increased rate of bone formation and increased serum E₂ level but not IGF-1 level in miglustat-treated F508del mice compared to untreated F508del mice.

Conclusion: This study provides clear evidence that oral administration of miglustat normalizes bone mass by increasing bone formation in F508del mice; these findings support the therapeutic potential of miglustat in patients with cystic fibrosis related bone disease.

Introduction

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive disorder caused by mutations of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), a cAMP-dependent anion channel leading to progressive pulmonary damage and ultimately to death (1-3). Brittle bones have been reported in children, adolescents and adults with CF, independently of sex, and has been termed CF-related bone disease (4-8). Over the past several years, vertebral fractures and the consequence dorsal kyphosis in patients with CF have been documented and may even decrease pulmonary function, thus accelerating the course of the disease and decreasing the quality of life in young patients (7, 9-11). Bone fragility, leading to fractures may exclude patients from candidacy for lung transplantation, which imposes limits on the best therapeutic option for these patients at the advanced stages of the disease (12). Different factors may have a negative effect on patient's bone health. Vitamin K and D insufficiency, calcium malabsorption, malnutrition, glucocorticoid use, delayed puberty and pulmonary infection/systemic inflammation seem to be the main determinants of bone health in patients with CF (8, 13-15). Whether *Cftr* gene dysfunction plays a direct role in bone metabolism remains to be elucidated, but this has been hypothesised on the basis of animal studies with the CFTR-null and F508del-CFTR mouse models (16, 17). We recently showed a severe osteopenic phenotype in young and adult CF mice homozygous for the F508del-CFTR mutation by reducing bone formation rate in both sexes (17). In humans, the expression of CFTR protein in bone cells has been identified by immunohistological observations (18); we have reported *in vitro* studies showing that the CFTR dysfunction affects human osteoblast activity (cells that form bone) (19).

Clinical trials are underway with the goal of finding new potential treatments and that might prevent the development of CF-related bone disease including: anti-resorptive agents such as oral bisphosphonates and anabolic agents such as human recombinant growth hormones (hrGH) and parathyroid hormone (PTH) (8, 20, 21). Miglustat, an N-alkylated iminosugar (N-butyldeoxynojirimicin, NB-DNJ, Zavesca®) is an orally approved drug by the US Food and Drug administration, the European Union for treating bone pathology in type I Gaucher disease (22-25), and for the other glycosphingolipidoses as well as viral infections (26, 27). NB-DNJ inhibits glucosylceramide synthase, and as a result prevents the formation of glycosylceramide. NB-DNJ facilitates this process through competitive inhibition of ceramide (23, 28). In CF lung pathology, its efficacy was reported to normalize sodium and *Cftr*-dependent chloride transport in nasal mucosa of F508del mice (29). Oral treatment with miglustat has been recently evaluated in 11 CF patients homozygous with the F508del mutation during a pilot phase IIa clinical trial (30). The conclusion of

this pilot trial was drawn that “there was no significant evidence of a treatment effect on any nasal potential difference variable.” However, there is a question of whether longer exposure periods than 8 days would have produced a more pronounced effect. The conclusion that no treatment effect was found is probably not justified, which argues in favour of continued consideration of miglustat, as recently discussed by Jenkins B and Glenn L(31).

In the present work, we investigated the effect of oral administration of miglustat in an CF mouse model homozygous for the F508 del mutation on parameters of the bone microarchitecture, histomorphometry and bone formation rate. Our findings provide clear evidence that once-day treatment with miglustat, over 4 weeks, normalizes bone mass in F508del mice. These data highlight the potential of oral miglustat as a therapy for cystic fibrosis bone disease.

Materials and methods

Mice

Rotterdam homozygous F508del-CFTR mice (F508del *Cftr*^{tm1Eur}) which express the clinically common F508del mutation in *Cftr* at wild type protein level and their normal *Cftr*^{+/+} homozygous littermates (WT mice in the FVB background) (32) were obtained from the Centre de Distribution, Typage et Archivage Animal, Centre National de la Recherche Scientifique (CDTA, Orléans, France). Young mice (6-week-old male) were housed at the Animal Care Facility of the University of Reims-Champagne Ardenne following recommendations of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations. Experimental procedures were conducted in accordance with the approval of the local ethics committee for animal welfare.

Miglustat treatment

Stocks solutions of 1200 mg/ml miglustat (N-butyldeoxynojirimicin, NB-DNJ, [Zavesca], Actelion Pharmaceuticals, Allshwil, Switzerland) were prepared in PBS solution, stored at -20°C and thawed the day when used. We have administrated 120 mg/kg/day miglustat once a day for 4 weeks by oral gavage to 6 weeks-old F508del and WT male mice. Age-matched-control groups received the same volume of vehicle, i.e. PBS solution only.

Three-dimensional micro-CT, scanning electron microscopy and X-ray spectra

At the start of each experiment, all mice were scanned with micro-computed tomography (Skyscan, Model 1076, 100kV, Scanco Medical AG, Brüttiselen, Switzerland). For longitudinal follow-up, the procedure was repeated once a week for 4 weeks. Scans of the lumbar vertebrae of 6-10 weeks-old F508del and WT mice were acquired *in vivo* to assess 2D and 3D bone microarchitecture, as described (). Details are shown in Table E1 in the online supplement data.

After 4 weeks of miglustat treatment, F508del and WT mice and respective untreated control groups were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (80 mg/kg, Virbac, France) and xylazine (Rompun, Bayer, Leverkusen, Germany, 20 mg/kg) as previously described (33). Lumbar vertebrae and femurs were stored in 70% ethanol and dehydrated in graded ethanol, defatted in xylene, and embedded in methyl methacrylate. Measurements of total calcium (Ca⁺⁺) and phosphate

(P) atomic concentrations in undecalcified vertebral sections (L4- L6 vertebrae) from X-ray spectra were carried to calculate a mean value of Ca/P atomic ratio, indicative of calcium phosphates level in the bone (34), as reported in our laboratory (35).

Bone histomorphometry

Two consecutive sections of vertebral and femoral bones were stained for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) detection using naphthol ASTR phosphate (Sigma, France) as substrate and then counterstained with toluidine blue (pH 4.3). The bone surface (BS), trabecular bone volume (BV/TV), trabecular bone width (Tb.Wi), trabecular number (Tb.N) and trabecular separation (Tb.Sp) were measured using a software package developed for bone histomorphometry (Microvision, Evry, France). Bone resorption parameters were measured on TRAP-stained sections for osteoclast surfaces and expressed as N.Oc/T.Am (per mm²). Histomorphometric parameters were recorded at this standard sampling site in compliance with the recommendations of the American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) Histomorphometry Nomenclature Committee (36). Double labeling of tetracycline and calcein *in vivo* was performed as described (37). The mineral apposition rate (MAR) was calculated according to the ASBMR nomenclature.

Serum analysis

Sera from miglustat-treated F508del and WT mice and their untreated controls were obtained and stored at -85°C until analysis of IGF-1 and 17 β -estradiol (E₂) levels. In the active IGF-I ELISA, IGF-1 was separated from its binding proteins in serum by using an ethanol and HCl-based extraction solution provided by the manufacturer (Millipore, Molsheim, France). Analysis of E₂ was undertaken with the following commercial assay (ELISAs for E₂, Millipore, Molsheim, France).

Statistical analysis

Data are reported as the mean \pm standard error of the mean unless stated otherwise. Using the statistical component of the software package SigmaPlot V11.2 (Jandel Scientific, SPSS Science, Chicago, IL) an unpaired *t*-test was run to compare two different groups unless either of the normality or equal variance tests failed, in which case a Mann Whitney rank sum test was performed. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Figure 1

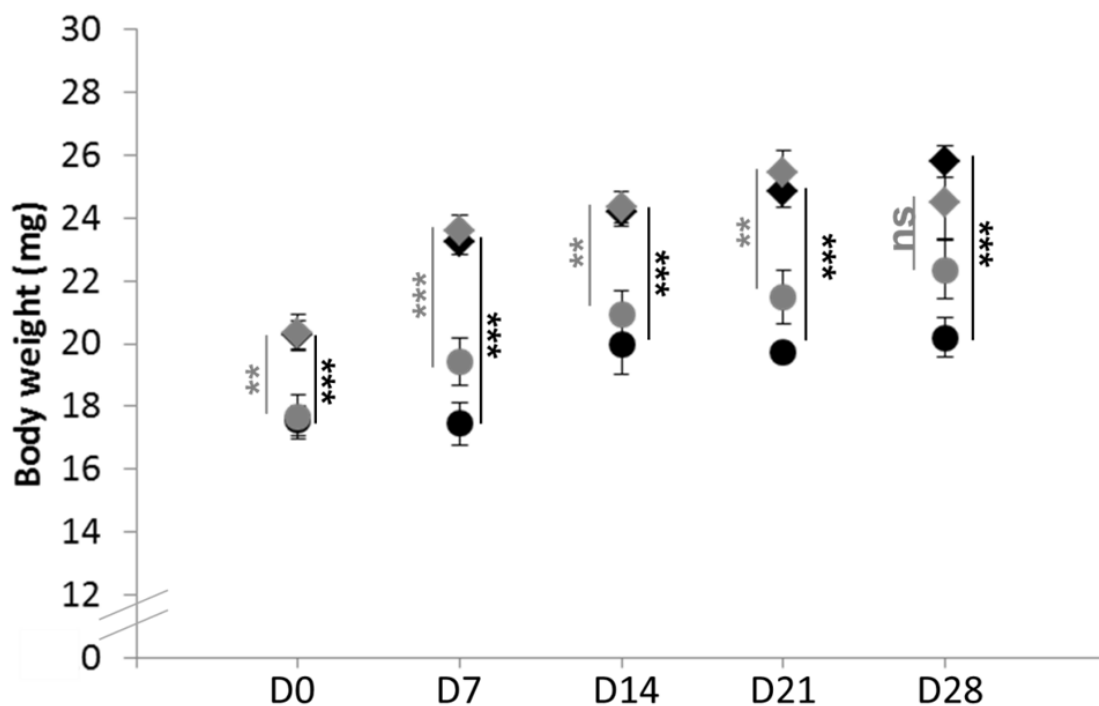


Figure 1. Growth of F508del and WT control mice in the presence or absence of miglustat. Body weights of F508del and WT control male mice were measured weekly during the course of drug treatment (once-day treatments with 120 mg/kg/day miglustat, over 4 weeks) and are plotted against time (white rhomb boxes, miglustat-treated WT mice; black rhomb boxes, PBS vehicle-WT mice; white circles, miglustat-treated F508del mice; black circles, PBS vehicle-F508del mice at the Day 0, D7, D14 and D28). At the beginning of the treatment (Day 0), average body weight of six-week-old F508del mice was 22 % less than six-week-old WT mice. Over the 4 weeks-treatment period, the miglustat-treated F508del mice grew faster than the PBS-vehicle F508del mice. The final body weights were 10 % higher in the miglustat-treated F508del mice compared to PBS vehicle-F508del mice. Data are mean \pm SEM for 7 to 9 animals per group. Statistical differences (ns, non significant; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) as assessed by independent-samples *t*-test.

Figure 2

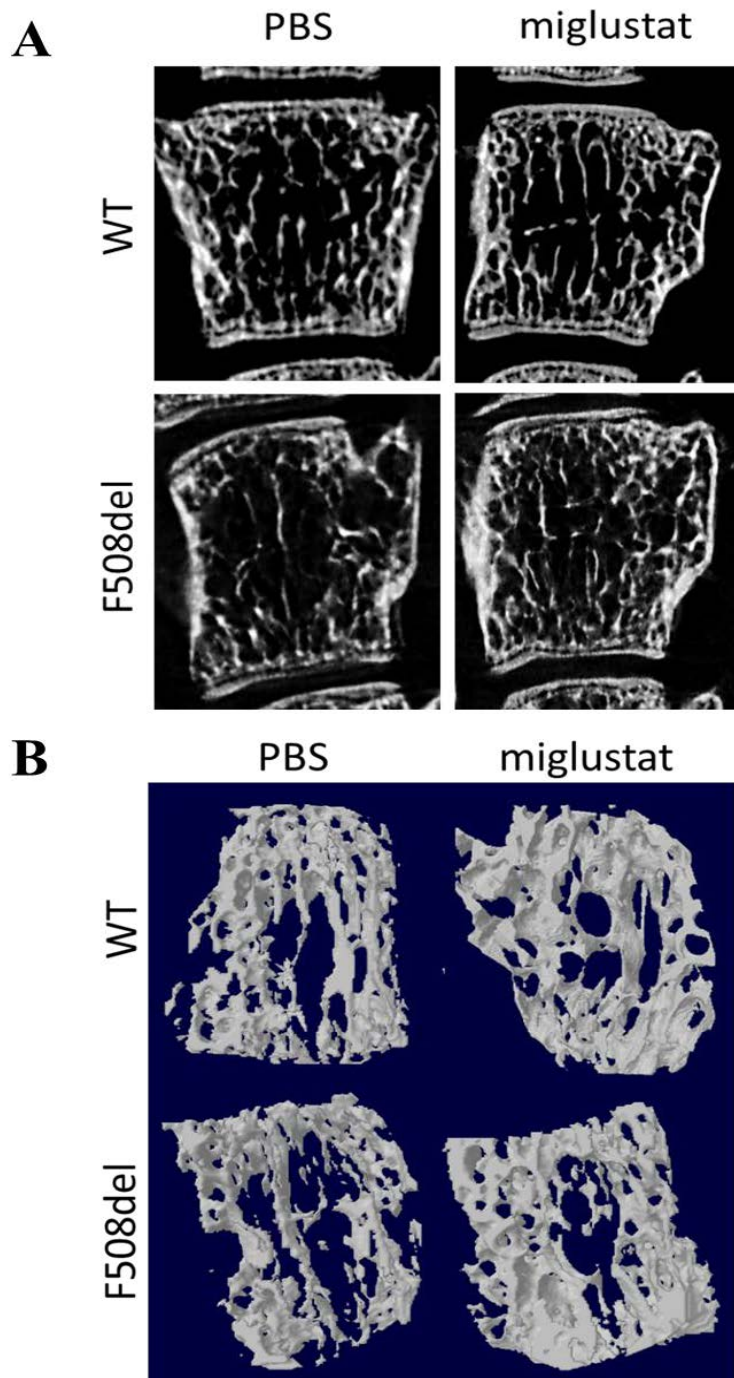


Figure 2. Morphology study by micro-CT scanning of lumbar spine in F508del and WT mice following a miglustat treatment. Representative 2D cross-sectional scans (A) and 3D reconstructions (B) show evidence that the connecting rods of trabeculae are disrupted in vertebrae in PBS-vehicle F508del mice compared to PBS-vehicle WT mice. Note that the treatment with miglustat increased the number of bone trabeculae and normalized trabecular bone volume of the vertebrae in F508del mice.

Figure 3

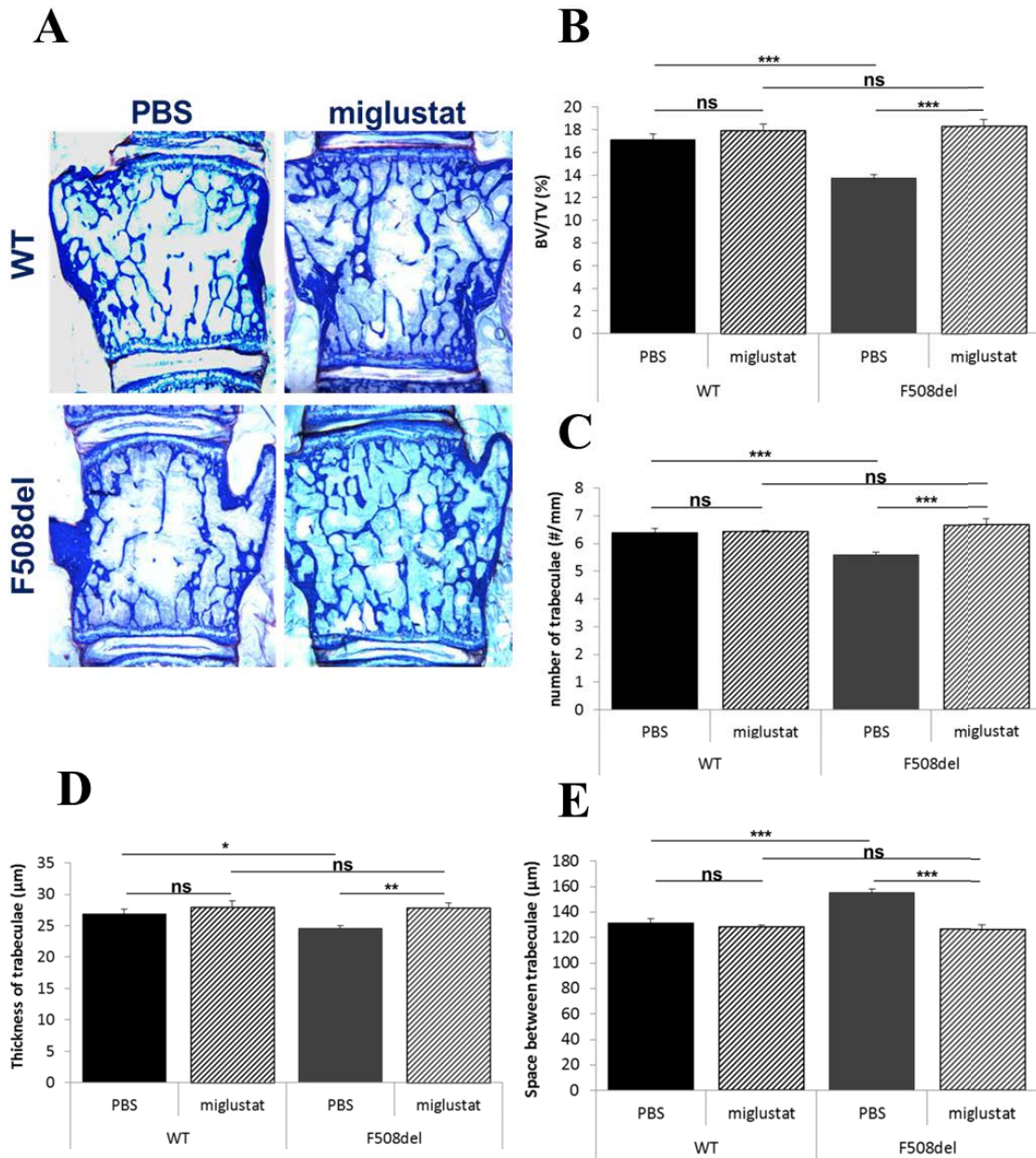


Figure 3. Static histomorphometric parameters of lumbar spine in F508del and WT mice following a miglustat treatment. (A) Representative sagittal sections of vertebral bone show miglustat's positive effect in increasing trabeculae number of F508del mice. (B) The trabecular bone volume of vertebrae is normalized in the miglustat-treated F508del mice compared to PBS-vehicle F508del mice. (C-E) Significant increases in number of trabeculae, in thickness of trabeculae and a significant decrease in space between trabeculae, respectively, were observed in miglustat-treated F508del mice compared to WT control mice. Data are mean \pm SEM for 7 to 9 animals per group. Statistical differences (ns, non significant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) as assessed by independent-samples *t*-test.

Figure 4

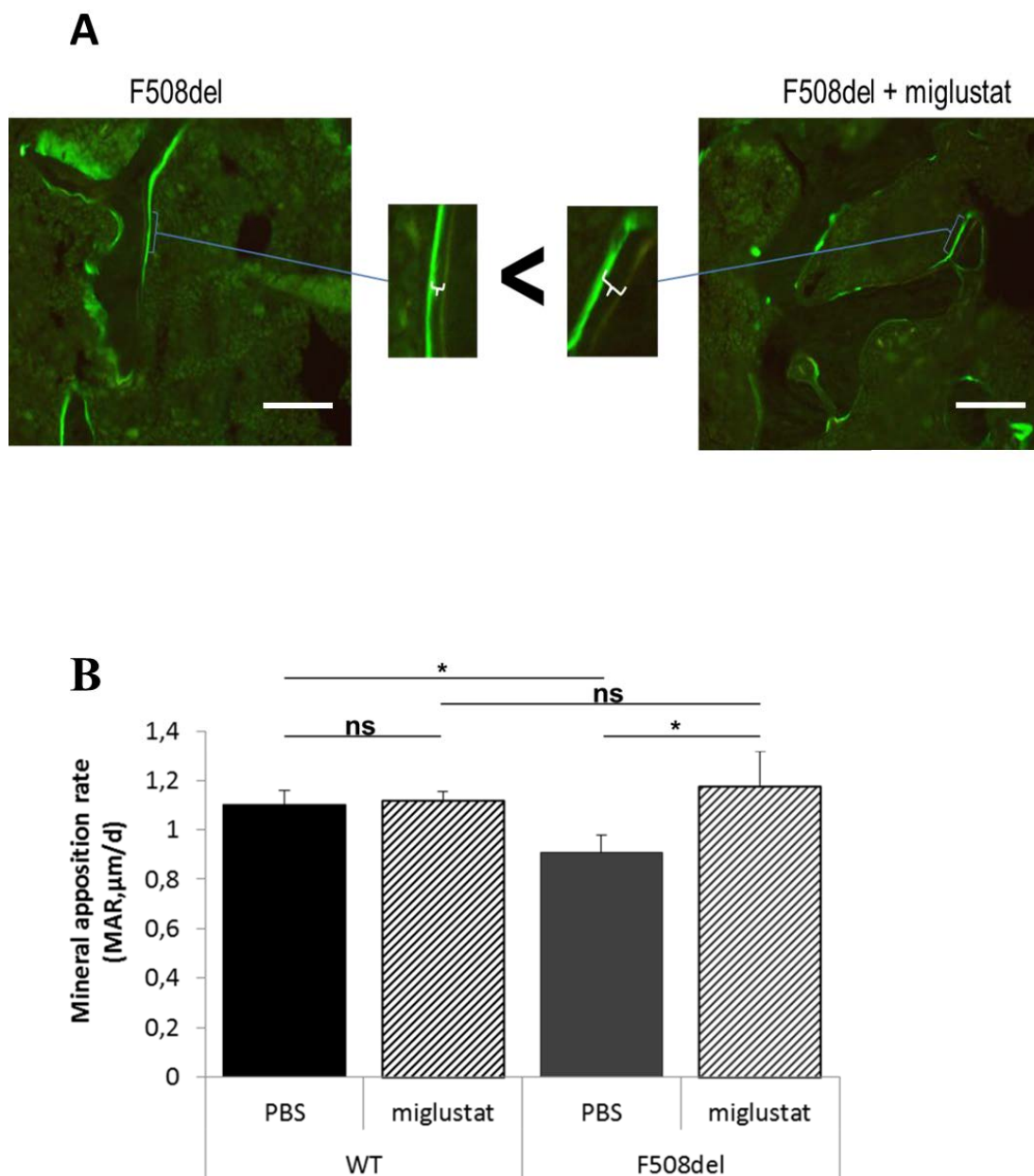


Figure 4. *In vivo* analysis of bone formation in F508del and WT mice following a miglustat treatment. (A) Fluorescent images of two representative sections of vertebral trabecular surface demonstrating tetracycline and calcein double fluorochrome labeling. White crockets specify distance between labeled bone surfaces, labeling for calcein was increased in miglustat-treated F508del mice compared to untreated F508del mice. Scale bar =10 μm . (B) The vertebrae from miglustat-treated F508del mice had increased mineral apposition rate compared to PBS-vehicle F508del mice. Data are mean \pm SEM for 5 to 6 animals per group. Statistical differences (ns, non significant; * $p < 0.05$) as assessed by independent-samples *t*-test.

Figure 5

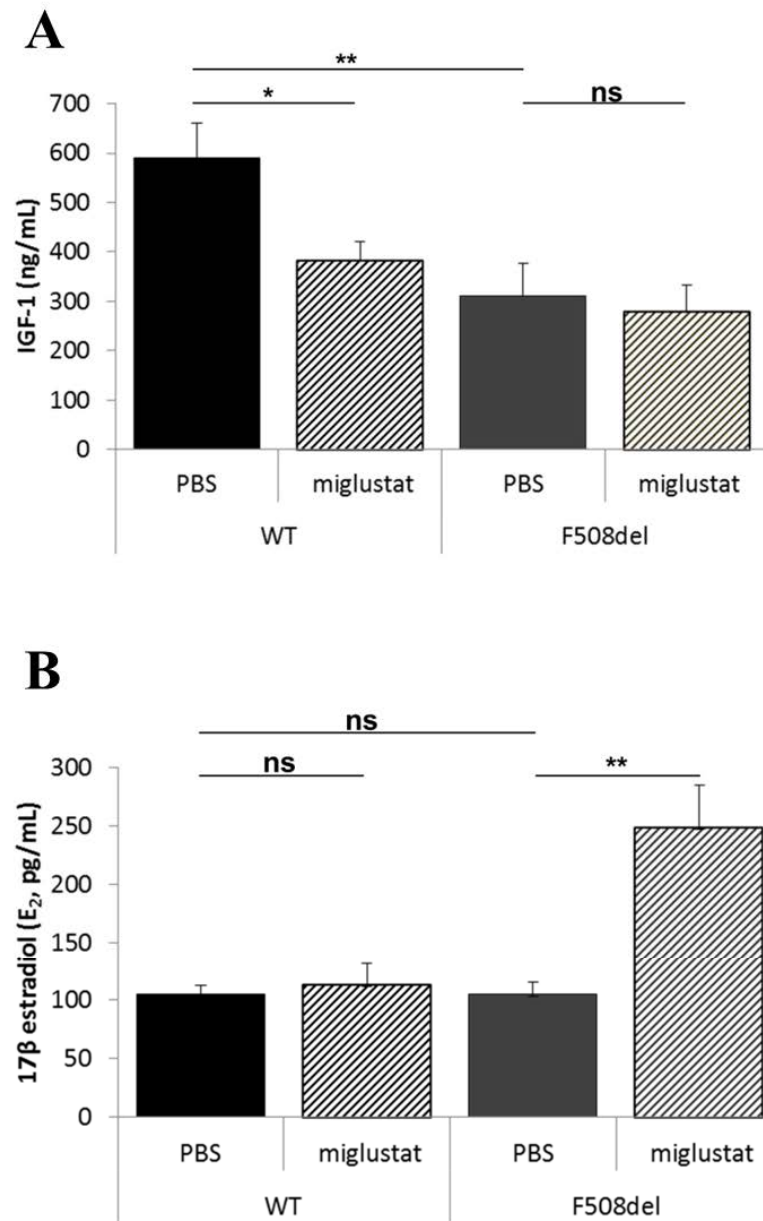


Figure 5. Serum IGF-1 and 17 β -estradiol (E₂) levels in F508del and WT mice following a miglustat treatment. (A) Serum IGF-1 levels were lower in PBS vehicle-F508del mice compared to PBS vehicle-WT mice. No significant difference in the levels of serum IGF-1 was found between the miglustat-treated F508del mice and PBS-vehicle F508del mice. (B) The level of serum E₂ in the miglustat-treated F508del mice was increased 2.5 fold compared to PBS-vehicle F508del mice. No significant difference in the levels of serum E₂ was found between the PBS-vehicle WT mice, miglustat-treated WT mice and PBS-vehicle F508del mice. Data are mean \pm SEM for 5 to 6 animals per group. Statistical differences (ns, non significant; *p < 0.05; **p < 0.01) as assessed by independent-samples *t*-test.

Supplementary figure.

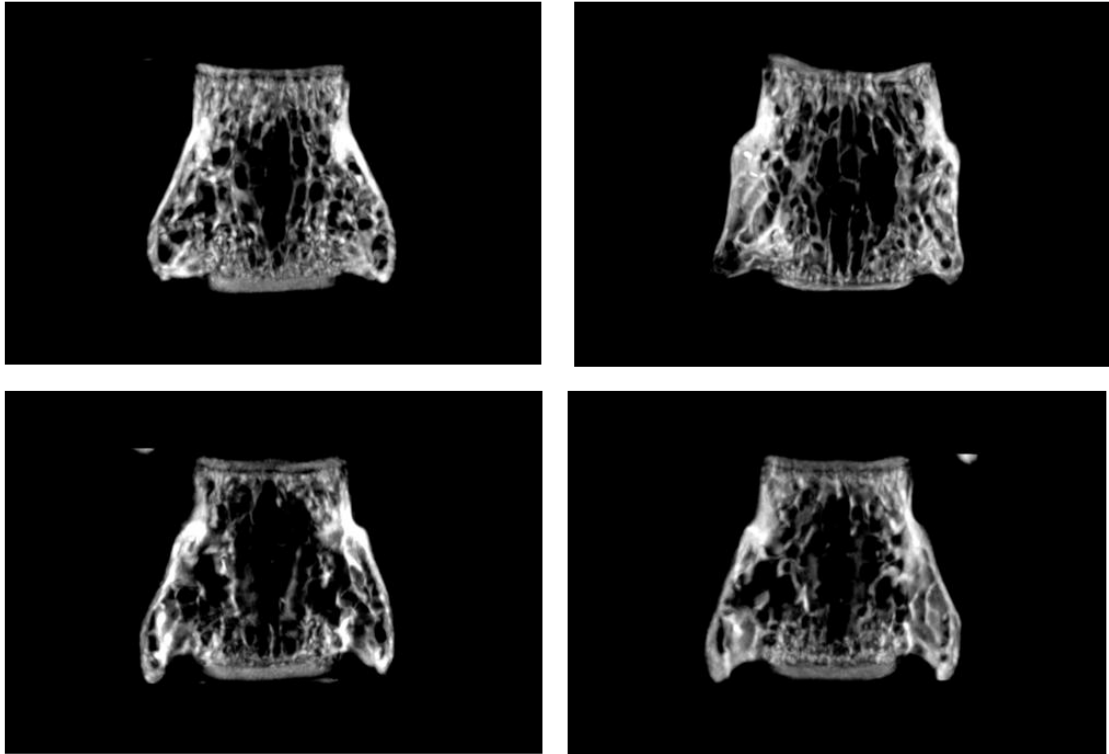


TABLE 1. CA/P ATOMIC RATIO OF VERTEBRAL BONES IN F508 DEL AND WT MICE FOLLOWING A MIGLUSTAT TREATMENT.

| Genotype | | N | Ca/P atomic ratio | P value |
|----------|-------------|---|-------------------|---------|
| WT | | 3 | 1,50 ± 0,01 | ns |
| WT | + miglustat | 3 | 1,49 ± 0,01 | ns |
| F508del | | 3 | 1,51 ± 0,00 | ns |
| F508del | + miglustat | 3 | 1,52 ± 0,01 | ns |

Definition of abbreviations: Ca/P = the atomic ratio of total calcium/phosphates in trabecular bone measured on the basis of high resolution X-ray spectra; NS = not significant. Undecalcified femoral sections coated with a conductive layer (carbon) of 14-week-old WT control and F508del *Cftr*^{tm1Eur} mice were observed using a LaB6 electron microscope (JEOL JSM-5400LV) operating at 15kV which is equipped with an ultra-thin window Si (Li) detector for X-ray measurements (GENESIS, Eloïse SARL, France). The Ca/P values represent the means ± SEM of three distinct areas analyzed in three femoral sections for 3 animals per group.

Results

Miglustat increases the body weight of young F508del mice

To monitor the overall well being of the mice treated with miglustat, the F508del and WT control mice were monitored daily, and the effects of miglustat on growth rates determined (Figure 1). As expected, average body weight of F508del mice was 22 % less than WT mice at 6 weeks of age (Day 0, at the beginning of the treatment). Over the treatment period (28 days, 120 mg/kg/day), the miglustat-treated F508del mice grew faster than the PBS vehicle-F508del mice. The final body weights attained at the end of the study were 10 % higher in the miglustat-treated F508del mice. It was interestingly to note that the average body weights of treated F508del mice were not significantly different of the miglustat-treated WT mice at the end of treatment. The mice had no diarrhea at any stage of the study. The general appearance, activity levels, and condition of the miglustat-treated F508del mice were comparable with the untreated controls (data not shown), indicating that animals tolerated miglustat and were not overtly compromised by its oral administration.

Miglustat increases bone mass of F508del mice

Bone trabecular bone density was evaluated by microcomputed tomography and histology. As illustrated in Figures 2A-2B, representative 2D cross-sectional scans and 3D reconstructions clearly show evidence of reduced trabecular bone of the lumbar spine (L4-L6 vertebrae) in F508del mice compared to their WT littermates. Ours results also clearly show that once-day treatments with miglustat over four weeks were able to completely eliminate any signs of osteopenia in the lumbar vertebrae of F508del mice. Representative 2D scans (Figures 2A) demonstrate that there is an increase in the number of bone trabeculae in miglustat-treated F508del mice compared to their untreated controls. Representative 3D reconstructions (Figures 2B) demonstrate that there is a marked increase of bone density in miglustat-treated F508del mice compared to their untreated controls. All micro-CT images observed from vertebrae were confirmed by analysis of the femurs (data not shown).

Miglustat ameliorates bone architecture of F508del mice

We next assessed architectural parameters in vertebral sagittal sections from F508del mice by histological measurements (Figure 3). Figure 3 A illustrates a reduction of vertebral trabecular bone of PBS-vehicle F508del mice compared to PBS-vehicle WT control, as we had previously observed in femoral bone of F508del mice compared to WT mice (17). Quantification of structural parameters revealed that bone volume/tissue volume (BV/TV%, percentage of trabecular bone volume) was decreased by 21% in PBS vehicle-F508del mice compared to PBS vehicle-WT controls (Figure 3B). Interestingly, this difference is totally eliminated when F508del mice were treated with miglustat, and increase their percentage of BV/TV to a level comparable to those observed in the WT mice. This significant increase in percentage of BV/TV in miglustat-treated F508del mice was associated with a significant increase in the number and thickness of bone trabeculae and a significant decrease of the trabecular bone separation compared to PBS-vehicle F508del mice (Figure 3C-E).

Miglustat increases bone formation of F508del mice

To analyze bone formation dynamics, the rate of new bone apposition, i.e. the trabecular mineral appositional rate (MAR) was evaluated *in vivo* after double labeling with tetracycline and calcein in F508del mice (Figure 4). Following treatment with miglustat, a significant increase of MAR (an increase of 30 %) was found in miglustat-treated F508del mice compared to PBS-vehicle F508del mice. Interestingly, the level of MAR found in miglustat-treated F508del mice was comparable and even higher to the level of MAR observed in PBS vehicle-WT mice. To investigate whether modifications of bone phenotype are related to nutritional deficiency and altered mineral homeostasis, we measured the total calcium and phosphate atomic ratio in undecalcified vertebral sections by X-ray analysis. No significant change in the Ca/P atomic ratio in vertebrae from X-ray spectra was found between all the studied F508del and WT control mice, before and after their treatment with miglustat (Table 1).

Influence of miglustat treatment on the levels of serum IGF-1 and E₂ of F508del mice

To further investigate whether changes in bone phenotype observed in miglustat-treated F508del mice may be related to alteration in changes of circulating levels of bone-growth factors, we measured levels of serum IGF-I and E₂ in all studied F508del and WT control mice, before and after their treatment with miglustat (Figure 5A). No significant change in serum IGF-1 level was found between the miglustat-treated F508del mice compared to PBS vehicle-F508del mice (Figure 5A). However, the level of serum IGF-1 was found significantly lower in PBS-vehicle F508del mice compared to PBS-vehicle WT controls, as we had already reported in young and adult F508del mice compared to age-matched WT mice (17). Following treatment with miglustat, a significant decrease of serum IGF-1 level was observed in miglustat-treated WT mice compared to PBS vehicle-WT controls.

The levels of serum E₂ were evaluated in all studied F508del and WT control mice, before and after their treatment with miglustat (Figure 5B). The level of serum E₂ in the miglustat-treated F508del mice increased 2.5 fold compared to PBS-vehicle F508del mice. No significant difference in the levels of serum E₂ was found between the PBS-vehicle WT mice, miglustat-treated WT mice and PBS-vehicle F508del mice.

Discussion

In the current study, we evaluate the effects of miglustat, administered *in vivo* at clinical dose, on the bone composition and microarchitecture in a CF mouse model homozygous for the F508del mutation. Because an oral treatment of miglustat is being conducted in clinical trials enrolling patients with CF to activate F508del-CFTR chloride channel function in lungs, preclinical studies using the F508del mice may be of great relevance for assessing its potential therapeutic efficacy in the CF related bone disease before miglustat can be evaluated in randomized, controlled trials in patients with CF. Our data provide clear evidence that once-day treatments of miglustat for 4 weeks, lead to the prevention of the low trabecular bone volume observed in this F508del mouse model. To our knowledge, this is the first report of the use of miglustat to prevent the early onset of osteopenia in CF. The F508del mice used in this study shows low but detectable residual CFTR activity, nearly normal mRNA levels of the mutant CFTR protein (32), and *in vivo* deposition of miglustat applied directly to the nasal epithelium of this F508del mouse has been recently reported to efficiently correct sodium and chloride conductances (29). Previously, we reported that this F508del mouse model develop an early severe osteopenic phenotype showing both a low bone volume and reduced bone formation rate, in two sexes (17). Therefore, these properties make this model a useful *in vivo* system for studying novel therapeutic strategies for other CF related phenotypes such the bone disease.

In the present study, we show that oral administration of miglustat normalizes the bone quantity and ameliorates the bone microarchitecture of F508del mice. It is worth noting that using this F508del mouse model to study the etiology of early onset osteopenia in CF has advantages over human studies because F508del mice, in contrast to CF patients, are not treated with glucocorticoids and has not been reported to develop lung inflammatory disease (32) while recent data based on quantitative lung histology showed mild inflammation in (16-19 weeks) adult F508del mice compared with their littermate controls (38). This allows us to rule out the involvement of these factors in the development of bone disease.

When administered orally for a 6 days-short period (39), the corrective effect of miglustat on the nasal mucosa of the F508del mice required a dose of 120-fold larger than the human therapeutic dose used in bone pathology in type 1 Gaucher disease (1200 mg/kg/day vs. 10 mg/kg/day to adult patient). In our study, we administered 120 mg/kg/day miglustat by oral gavage for a 4 weeks-period. Following the treatment, the miglustat-treated F508del mice increased their body weight (a 10 % increase), remained healthy, active and free from any overt signs of pathology. The beneficial

effect of miglustat on the increase of bone mass and bone formation rate may be explained by the drug's wide tissue distribution, even in deep organs such as bone (40). The effect of miglustat on the increased rate of bone formation after only 4 weeks of miglustat treatment suggests a direct influence on bone turnover, at the trabecular level as indicated by the full correction of bone volume at the lumbar spine in the F508del mice.

In humans, vitamin D deficiency also results in impaired bone density due to decreased calcium absorption. Although lower serum 25-hydroxyvitamin D levels are commonly seen in patients with CF compared to non-CF population, cross-sectional studies show no clear association between the vitamin D status and bone density of CF patients (5). In addition, vitamin D supplementation show no evidence of benefits on bone density, fractures and bone turnover markers in CF individuals (8, 41). Adequate calcium intake is essential to achieve an optimal peak bone mass. We here reported a comparable total calcium/phosphate atomic ratio in vertebral bone between the miglustat-treated F508del mice, PBS vehicle-F508del mice, miglustat-treated WT mice and PBS vehicle-WT mice. In support of this contention, Hillman and co-workers showed that in patients with CF, the percentage true calcium absorption was in the normal range based on age and pubertal state compared to control population (42).

The precise mechanisms of action of miglustat for increasing bone mass require further studies. Bone remodeling is also tightly regulated by a number of hormones, growth factors, and prostaglandins (43, 44). We and others have shown that circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth (45-47). Reduced levels of serum IGF-1 were recently found to be related to the presence of osteoporotic fractures in male idiopathic osteoporosis (48). Studies have reported that CF newborns are shorter and have a lower body weight than non-CF newborns (49). Others have suggested that reduced levels of serum IGF-1 might be responsible, at least in part, for the growth defect reported in patients with CF (50), which was also observed in both *Cftr*^{-/-} mouse and newborn *Cftr*^{-/F508} pig models (51, 52). We previously found, as also observed in the present study, markedly lower levels of serum IGF-1 in the F508del mice (17) which might contribute to osteoblast failure and impaired bone formation (45, 53). However, this hypothesis is not supported by the unchanged levels of serum IGF-1 that we report here in miglustat treated-F508del mice exhibiting increased bone mass.

E₂ is a major hormone in the maintenance of bone health, E₂ deficiency being associated with reduced bone mass and formation in both humans and mice (54-56). A positive relationship was found between low serum E₂ level and prevalent vertebral fractures in CF patients, in both genders (57). Robust studies have showed that E₂ deprivation reduce bone formation by activation of the pro-

inflammatory NF- κ B signaling in osteoblasts (58, 59). We and others have proposed that the F508del-CFTR protein in CF lung cells causes pro-inflammatory cytokine production through the NF- κ B activation which is normally blocked by normal CFTR (60-63). A recent study has shown that E₂ exposure in CF bronchial epithelium reduces IL-8 production through NF- κ B signaling (64). Interestingly, both the CF mouse models with the 489X and F508del mutation in CFTR had higher follicular stimulating hormone levels, suggesting a possible lower serum E₂ level (65, 66). In our study, we show no significant difference in the levels of serum E₂ between the F508del mice and their littermate controls. However, we observed a 2.5 fold increase of serum E₂ level in miglustat-treated F508del mice compared to untreated F508del mice but not in miglustat-treated WT controls. Increased circulating serum E₂ level in miglustat-treated F508del mice might be a causal factor in the increased rate of bone formation. How the miglustat increases the serum E₂ level in F508del mice remains, to date, to be investigated.

Another interesting observation is that miglustat is an inhibitor of α -glucosidases (67) and therefore regulates the turnover of glycosphingolipids by reversibly inhibiting glucosylceramide synthase (68, 69). This process catalyzes the first committed steps in glycosphingolipids synthesis and conversely induces increased ceramide accumulation. Reports have suggested that ceramide have an important role in modulating bone metabolism (70). Both CF patients with the F508del mutation and *Cftr* knockout mice display lower levels of ceramide in plasma, lungs, and other CF-affected organs (71). Thus, it could be postulated that beneficial effects of miglustat on bone formation might at least partly, be mediated by correction of the ceramide defect. Future studies will be needed to investigate the potential relationships between the serum ceramide level and bone formation following a miglustat treatment in the F508del mice.

Early recognition, prevention, and treatment are keys to maintaining optimal bone health in patients with CF. Various therapies are currently available for treatment of post-menopausal osteoporosis and people receiving long-term oral corticosteroids, but these have not been studied in individuals with CF (7). Biphosphonates are a class of drugs that inhibit bone resorption through their inhibitory action on osteoclasts function and survival. A 2012 Cochrane Database review identified nine randomised control trials of biphosphonate therapy in a total of 237 adult patients with CF. After 12 months, bone mineral density values at the lumbar spine and femur were increased but the fracture risk was not significantly decreased (72). Several learned societies recommend oral or intravenous bisphosphonate therapy in adults with CF whose T-score or Z-score is lower than -2, who are on the transplant waiting list, or whose, bone mineral density values decrease by more than 3% to 5% per year (4). Clinical trial data is especially limited in the pediatric age group. The European cystic fibrosis bone mineralization guidelines recently highlighted controversial issues such as the use

of biphosphonates and vitamin D supplementation regimens in children and adolescents indicating the urgent need for therapeutic trials for treating CF-related bone disease (8, 14). The use of biphosphonates in children with CF is more controversial because of potential long-term safety concerns including over suppression of bone remodelling (73).

In conclusion, the present study provides evidence that miglustat administrated *in vivo* normalizes trabecular bone volume in F508del CF mice. Since this drug has already been approved in adult patients with type I Gaucher disease and in adult and pediatric patients with Niemann-Pick disease type C (23, 74, 75), our data provide a strong rationale for oral administration of miglustat for young and adult patients with CF related bone disease.

Acknowledgment

The authors thank Marie Françoise Bertrand (CDTA, Orleans, France) for providing Rotterdam FVB *Cftr*^{tm1Eur} mice (b.scholte@erasmusmc.nl). The FVB *Cftr*^{tm1Eur} mice were developed with the support of EURO CARECF. We also wish to thank Christine Guillaume and Sylvie Bouthors (EA 4691 « Biomatériaux et Inflammation en site osseux » SFR CAP-Santé, FED 4231, Université Reims Champagne Ardenne, Reims, France) for their excellent technical assistance.

References

1. Davis, P. B. 2006. Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med* 173(5):475-82.
2. Kerem, B., J. M. Rommens, J. A. Buchanan, D. Markiewicz, T. K. Cox, A. Chakravarti, M. Buchwald, and L. C. Tsui. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245(4922):1073-80.
3. Riordan, J. R. 2008. CFTR function and prospects for therapy. *Annu Rev Biochem* 77:701-26.
4. Aris, R. M., P. A. Merkel, L. K. Bachrach, D. S. Borowitz, M. P. Boyle, S. L. Elkin, T. A. Guise, D. S. Hardin, C. S. Haworth, M. F. Holick, P. M. Joseph, K. O'Brien, E. Tullis, N. B. Watts, and T. B. White. 2005. Guide to bone health and disease in cystic fibrosis. *J Clin Endocrinol Metab* 90(3):1888-96.
5. Haworth, C. S. 2010. Impact of cystic fibrosis on bone health. *Curr Opin Pulm Med* 16(6):616-22.
6. Bianchi, M. L., G. Romano, S. Saraifoger, D. Costantini, C. Limonta, and C. Colombo. 2006. BMD and body composition in children and young patients affected by cystic fibrosis. *J Bone Miner Res* 21(3):388-96.
7. Gore, A. P., S. H. Kwon, and A. E. Stenbit. 2010. A roadmap to the brittle bones of cystic fibrosis. *J Osteoporos* 2011:926045.
8. Sermet-Gaudelus, I., M. L. Bianchi, M. Garabedian, R. M. Aris, A. Morton, D. S. Hardin, S. L. Elkin, J. E. Compston, S. P. Conway, M. Castanet, S. Wolfe, and C. S. Haworth. 2011. European cystic fibrosis bone mineralisation guidelines. *J Cyst Fibros* 10 Suppl 2:S16-23.
9. Paccou, J., N. Zeboulon, C. Combescure, L. Gossec, and B. Cortet. 2010. The prevalence of osteoporosis, osteopenia, and fractures among adults with cystic fibrosis: a systematic literature review with meta-analysis. *Calcif Tissue Int* 86(1):1-7.
10. Tejero Garcia, S., M. A. Giraldez Sanchez, P. Cejudo, E. Quintana Gallego, J. Dapena, R. Garcia Jimenez, P. Cano Luis, and I. Gomez de Terreros. Bone health, daily physical activity, and exercise tolerance in patients with cystic fibrosis. *Chest* 140(2):475-81.
11. Aris, R. M., J. B. Renner, A. D. Winders, H. E. Buell, D. B. Riggs, G. E. Lester, and D. A. Ontjes. 1998. Increased rate of fractures and severe kyphosis: sequelae of living into adulthood with cystic fibrosis. *Ann Intern Med* 128(3):186-93.
12. Shane, E., S. J. Silverberg, D. Donovan, A. Papadopoulos, R. B. Staron, V. Adesso, B. Jorgesen, C. McGregor, and L. Schulman. 1996. Osteoporosis in lung transplantation candidates with end-stage pulmonary disease. *Am J Med* 101(3):262-9.
13. Javier, R. M., and J. Jacquot. Bone disease in cystic fibrosis: What's new? *Joint Bone Spine*.
14. Sermet-Gaudelus, I., M. Castanet, G. Retsch-Bogart, and R. M. Aris. 2009. Update on cystic fibrosis-related bone disease: a special focus on children. *Paediatr Respir Rev* 10(3):134-42.

15. Ionescu, A. A., L. S. Nixon, W. D. Evans, M. D. Stone, V. Lewis-Jenkins, K. Chatham, and D. J. Shale. 2000. Bone density, body composition, and inflammatory status in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 162(3 Pt 1):789-94.
16. Haston, C. K., W. Li, A. Li, M. Lafleur, and J. E. Henderson. 2008. Persistent osteopenia in adult cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med* 177(3):309-15.
17. Le Henaff, C., A. Gimenez, E. Hay, C. Marty, P. Marie, and J. Jacquot. 2012. The F508del mutation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene impacts bone formation. *Am J Pathol* 180(5):2068-75.
18. Shead, E. F., C. S. Haworth, A. M. Condliffe, D. J. McKeon, M. A. Scott, and J. E. Compston. 2007. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) is expressed in human bone. *Thorax* 62(7):650-1.
19. Le Heron, L., C. Guillaume, F. Velard, J. Braux, L. Touqui, S. Moriceau, I. Sermet-Gaudelus, D. Laurent-Maquin, and J. Jacquot. 2010. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) regulates the production of osteoprotegerin (OPG) and prostaglandin (PG) E(2) in human bone. *J Cyst Fibros* 9(1):69-72.
20. Hecker, T. M., and R. M. Aris. 2004. Management of osteoporosis in adults with cystic fibrosis. *Drugs* 64(2):133-47.
21. Papaioannou, A., C. C. Kennedy, A. Freitag, G. Ioannidis, J. O'Neill, C. Webber, M. Pui, Y. Berthiaume, H. R. Rabin, N. Paterson, A. Jeanneret, E. Matouk, J. Villeneuve, M. Nixon, and J. D. Adachi. 2008. Alendronate once weekly for the prevention and treatment of bone loss in Canadian adult cystic fibrosis patients (CFOS trial). *Chest* 134(4):794-800.
22. Pastores, G. M., D. Elstein, M. Hrebicek, and A. Zimran. 2007. Effect of miglustat on bone disease in adults with type 1 Gaucher disease: a pooled analysis of three multinational, open-label studies. *Clin Ther* 29(8):1645-54.
23. Venier, R. E., and S. A. Igdoura. Miglustat as a therapeutic agent: prospects and caveats. *J Med Genet* 49(9):591-7.
24. Cox, T., R. Lachmann, C. Hollak, J. Aerts, S. van Weely, M. Hrebicek, F. Platt, T. Butters, R. Dwek, C. Moyses, I. Gow, D. Elstein, and A. Zimran. 2000. Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis. *Lancet* 355(9214):1481-5.
25. Elstein, D., C. Hollak, J. M. Aerts, S. van Weely, M. Maas, T. M. Cox, R. H. Lachmann, M. Hrebicek, F. M. Platt, T. D. Butters, R. A. Dwek, and A. Zimran. 2004. Sustained therapeutic effects of oral miglustat (Zavesca, N-butyldeoxynojirimycin, OGT 918) in type I Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis* 27(6):757-66.
26. Jacob, J. R., K. Mansfield, J. E. You, B. C. Tennant, and Y. H. Kim. 2007. Natural iminosugar derivatives of 1-deoxynojirimycin inhibit glycosylation of hepatitis viral envelope proteins. *J Microbiol* 45(5):431-40.

27. Lubamba, B., B. Dhooghe, S. Noel, and T. Leal. 2012. Cystic fibrosis: Insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy. *Clin Biochem*.
28. Andersson, U., T. D. Butters, R. A. Dwek, and F. M. Platt. 2000. N-butyldeoxygalactonojirimycin: a more selective inhibitor of glycosphingolipid biosynthesis than N-butyldeoxynojirimycin, in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol* 59(7):821-9.
29. Lubamba, B., J. Lebacqz, P. Lebecque, R. Vanbever, A. Leonard, P. Wallemacq, and T. Leal. 2009. Airway delivery of low-dose miglustat normalizes nasal potential difference in F508del cystic fibrosis mice. *Am J Respir Crit Care Med* 179(11):1022-8.
30. Leonard, A., P. Lebecque, J. Dingemans, and T. Leal. 2012. A randomized placebo-controlled trial of miglustat in cystic fibrosis based on nasal potential difference. *J Cyst Fibros* 11(3):231-6.
31. Jenkins, B. A., and L. L. Glenn. 2012. Miglustat effects on the basal nasal potential differences in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*.
32. van Doorninck, J. H., P. J. French, E. Verbeek, R. H. Peters, H. Morreau, J. Bijman, and B. J. Scholte. 1995. A mouse model for the cystic fibrosis delta F508 mutation. *Embo J* 14(18):4403-11.
33. Bonvin, E., P. Le Rouzic, J. F. Bernaudin, C. H. Cottart, C. Vandebrouck, A. Crie, T. Leal, A. Clement, and M. Bonora. 2008. Congenital tracheal malformation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-deficient mice. *J Physiol* 586(13):3231-43.
34. Dorozhkin, S. V., and M. Epple. 2002. Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew Chem Int Ed Engl* 41(17):3130-46.
35. Drevet, R., F. Velard, S. Potiron, D. Laurent-Maquin, and H. Benhayoune. In vitro dissolution and corrosion study of calcium phosphate coatings elaborated by pulsed electrodeposition current on Ti6Al4V substrate. *J Mater Sci Mater Med* 22(4):753-61.
36. Parfitt, A. M., M. K. Drezner, F. H. Glorieux, J. A. Kanis, H. Malluche, P. J. Meunier, S. M. Ott, and R. R. Recker. 1987. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2(6):595-610.
37. Vignery, A., and R. Baron. 1980. Dynamic histomorphometry of alveolar bone remodeling in the adult rat. *Anat Rec* 196(2):191-200.
38. Wilke, M., R. M. Buijs-Offerman, J. Aarbiou, W. H. Colledge, D. N. Sheppard, L. Touqui, A. Bot, H. Jorna, H. R. de Jonge, and B. J. Scholte. Mouse models of cystic fibrosis: phenotypic analysis and research applications. *J Cyst Fibros* 10 Suppl 2:S152-71.
39. Noel, S., M. Wilke, A. G. Bot, H. R. De Jonge, and F. Becq. 2008. Parallel improvement of sodium and chloride transport defects by miglustat (n-butyldeoxynojirimycin) in cystic fibrosis epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 325(3):1016-23.
40. Treiber, A., O. Morand, and M. Clozel. 2007. The pharmacokinetics and tissue distribution of the glucosylceramide synthase inhibitor miglustat in the rat. *Xenobiotica* 37(3):298-314.

41. Haworth, C. S., A. M. Jones, J. E. Adams, P. L. Selby, and A. K. Webb. 2004. Randomised double blind placebo controlled trial investigating the effect of calcium and vitamin D supplementation on bone mineral density and bone metabolism in adult patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 3(4):233-6.
42. Hillman, L. S., J. T. Cassidy, M. F. Popescu, J. E. Hewett, J. Kyger, and J. D. Robertson. 2008. Percent true calcium absorption, mineral metabolism, and bone mineralization in children with cystic fibrosis: effect of supplementation with vitamin D and calcium. *Pediatr Pulmonol* 43(8):772-80.
43. Marie, P. J. 2009. Bone cell-matrix protein interactions. *Osteoporos Int* 20(6):1037-42.
44. Giustina, A., G. Mazziotti, and E. Canalis. 2008. Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton. *Endocr Rev* 29(5):535-59.
45. Yakar, S., C. J. Rosen, W. G. Beamer, C. L. Ackert-Bicknell, Y. Wu, J. L. Liu, G. T. Ooi, J. Setser, J. Frystyk, Y. R. Boisclair, and D. LeRoith. 2002. Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *J Clin Invest* 110(6):771-81.
46. Kawai, M., and C. J. Rosen. 2012. The insulin-like growth factor system in bone: basic and clinical implications. *Endocrinol Metab Clin North Am* 41(2):323-33, vi.
47. Machwate, M., E. Zerath, X. Holy, P. Pastoureau, and P. J. Marie. 1994. Insulin-like growth factor-I increases trabecular bone formation and osteoblastic cell proliferation in unloaded rats. *Endocrinology* 134(3):1031-8.
48. Paccou, J., J. Dewailly, and B. Cortet. 2012. Reduced levels of serum IGF-1 is related to the presence of osteoporotic fractures in male idiopathic osteoporosis. *Joint Bone Spine* 79(1):78-82.
49. Festini, F., G. Taccetti, T. Repetto, M. F. Reali, S. Campana, G. Mergni, L. Marianelli, and M. de Martino. 2005. Gestational and neonatal characteristics of children with cystic fibrosis: a cohort study. *J Pediatr* 147(3):316-20.
50. Switzer, M., J. Rice, M. Rice, and D. S. Hardin. 2009. Insulin-like growth factor-I levels predict weight, height and protein catabolism in children and adolescents with cystic fibrosis. *J Pediatr Endocrinol Metab* 22(5):417-24.
51. Rogan, M. P., L. R. Reznikov, A. A. Pezzulo, N. D. Gansemer, M. Samuel, R. S. Prather, J. Zabner, D. C. Fredericks, P. B. McCray, Jr., M. J. Welsh, and D. A. Stoltz. 2010. Pigs and humans with cystic fibrosis have reduced insulin-like growth factor 1 (IGF1) levels at birth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(47):20571-5.
52. Rosenberg, L. A., M. D. Schluchter, A. F. Parlow, and M. L. Drumm. 2006. Mouse as a model of growth retardation in cystic fibrosis. *Pediatr Res* 59(2):191-5.
53. Kasukawa, Y., N. Miyakoshi, and S. Mohan. 2004. The anabolic effects of GH/IGF system on bone. *Curr Pharm Des* 10(21):2577-92.
54. Engdahl, C., C. Jochems, S. H. Windahl, A. E. Borjesson, C. Ohlsson, H. Carlsten, and M. K. Lagerquist. Amelioration of collagen-induced arthritis and immune-associated bone loss through

signaling via estrogen receptor alpha, and not estrogen receptor beta or G protein-coupled receptor 30. *Arthritis Rheum* 62(2):524-33.

55. Holmdahl, R., L. Jansson, and M. Andersson. 1986. Female sex hormones suppress development of collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum* 29(12):1501-9.

56. Chow, J., J. H. Tobias, K. W. Colston, and T. J. Chambers. 1992. Estrogen maintains trabecular bone volume in rats not only by suppression of bone resorption but also by stimulation of bone formation. *J Clin Invest* 89(1):74-8.

57. Rossini, M., A. Del Marco, F. Dal Santo, D. Gatti, C. Braggion, G. James, and S. Adami. 2004. Prevalence and correlates of vertebral fractures in adults with cystic fibrosis. *Bone* 35(3):771-6.

58. Chang, J., Z. Wang, E. Tang, Z. Fan, L. McCauley, R. Franceschi, K. Guan, P. H. Krebsbach, and C. Y. Wang. 2009. Inhibition of osteoblastic bone formation by nuclear factor-kappaB. *Nat Med* 15(6):682-9.

59. Novack, D. V. 2011. Role of NF-kappaB in the skeleton. *Cell Res* 21(1):169-82.

60. Hunter, M. J., K. J. Treharne, A. K. Winter, D. M. Cassidy, S. Land, and A. Mehta. 2011. Expression of wild-type CFTR suppresses NF-kappaB-driven inflammatory signalling. *PLoS One* 5(7):e11598.

61. Jacquot, J., O. Tabary, and A. Clement. 2008. Hyperinflammation in airways of cystic fibrosis patients: what's new? *Expert Rev Mol Diagn* 8(4):359-63.

62. Tabary, O., S. Escotte, J. P. Couetil, D. Hubert, D. Dusser, E. Puchelle, and J. Jacquot. 2000. High susceptibility for cystic fibrosis human airway gland cells to produce IL-8 through the I kappa B kinase alpha pathway in response to extracellular NaCl content. *J Immunol* 164(6):3377-84.

63. Vij, N., S. Mazur, and P. L. Zeitlin. 2009. CFTR is a negative regulator of NFkappaB mediated innate immune response. *PLoS ONE* 4(2):e4664.

64. Chotirmall, S. H., C. M. Greene, I. K. Oglesby, W. Thomas, S. J. O'Neill, B. J. Harvey, and N. G. McElvaney. 2010. 17Beta-estradiol inhibits IL-8 in cystic fibrosis by up-regulating secretory leucoprotease inhibitor. *Am J Respir Crit Care Med* 182(1):62-72.

65. Chen, H., J. H. Guo, Y. C. Lu, G. L. Ding, M. K. Yu, L. L. Tsang, K. L. Fok, X. M. Liu, X. H. Zhang, Y. W. Chung, P. Huang, H. Huang, and H. C. Chan. 2012. Impaired CFTR-dependent amplification of FSH-stimulated estrogen production in cystic fibrosis and PCOS. *J Clin Endocrinol Metab* 97(3):923-32.

66. Hodges, C. A., M. R. Palmert, and M. L. Drumm. 2008. Infertility in females with cystic fibrosis is multifactorial: evidence from mouse models. *Endocrinology* 149(6):2790-7.

67. Amiri, M., and H. Y. Naim. 2012. Miglustat-induced intestinal carbohydrate malabsorption is due to the inhibition of alpha-glucosidases, but not beta-galactosidases. *J Inherit Metab Dis*.

68. Platt, F. M., G. R. Neises, R. A. Dwek, and T. D. Butters. 1994. N-butyldeoxynojirimycin is a novel inhibitor of glycolipid biosynthesis. *J Biol Chem* 269(11):8362-5.

69. Platt, F. M., G. R. Neises, G. B. Karlsson, R. A. Dwek, and T. D. Butters. 1994. N-butyldeoxygalactonojirimycin inhibits glycolipid biosynthesis but does not affect N-linked oligosaccharide processing. *J Biol Chem* 269(43):27108-14.
70. Gronowitz, E., D. Mellstrom, and B. Strandvik. 2006. Serum phospholipid fatty acid pattern is associated with bone mineral density in children, but not adults, with cystic fibrosis. *Br J Nutr* 95(6):1159-65.
71. Guilbault, C., J. B. De Sanctis, G. Wojewodka, Z. Saeed, C. Lachance, T. A. Skinner, R. M. Vilela, S. Kubow, L. C. Lands, M. Hajduch, E. Matouk, and D. Radzioch. 2008. Fenretinide corrects newly found ceramide deficiency in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 38(1):47-56.
72. Conwell, L. S., and A. B. Chang. 2012. Bisphosphonates for osteoporosis in people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* 4:CD002010.
73. Whyte, M. P., W. H. McAlister, D. V. Novack, K. L. Clements, P. L. Schoenecker, and D. Wenkert. 2008. Bisphosphonate-induced osteopetrosis: novel bone modeling defects, metaphyseal osteopenia, and osteosclerosis fractures after drug exposure ceases. *J Bone Miner Res* 23(10):1698-707.
74. Galanaud, D., A. Tourbah, S. Lehericy, N. Leveque, B. Heron, T. Billette de Villemeur, N. Guffon, F. Feillet, N. Baumann, M. T. Vanier, and F. Sedel. 2009. 24 month-treatment with miglustat of three patients with Niemann-Pick disease type C: follow up using brain spectroscopy. *Mol Genet Metab* 96(2):55-8.
75. Wraith, J. E., D. Vecchio, E. Jacklin, L. Abel, H. Chadha-Boreham, C. Luzy, R. Giorgino, and M. C. Patterson. Miglustat in adult and juvenile patients with Niemann-Pick disease type C: long-term data from a clinical trial. *Mol Genet Metab* 99(4):351-7.

Tout au long du traitement, les souris ont été gavées tous les jours et suivies de manière régulière. Le gavage s'effectue une fois par jour, à l'aide d'une solution contenant du miglustat (120 mg/kg) et pendant 4 semaines. Le traitement commence à l'âge de 6 semaines (avant la puberté) et se termine à l'âge de 10 semaines (puberté). L'évaluation des paramètres osseux a été réalisée sur des souris homozygotes pour la mutation F508del-CFTR, mâles.

Comparativement à des souris normales, les souris F508del ont un poids significativement plus bas, au début du traitement. A la fin du traitement, les souris F508del ayant reçu le miglustat ont un poids corporel plus élevé que leur contrôle F508del et se rapproche du poids des souris normales. Les souris F508del, traitées par le miglustat, n'ont pas de diarrhée et une activité physique semblable aux souris contrôles, F508del et normales.

Lors de l'analyse de la microarchitecture osseuse par micro CT et par histomorphométrie, nous avons observé, chez les souris F508del traitées, par rapport à leur contrôle :

- Une modification de l'architecture trabéculaire osseuse avec :
 - o Une augmentation du volume osseux,
 - o Une augmentation de l'épaisseur des travées osseuses,
 - o Une augmentation du nombre de travées osseuses,
 - o Une diminution de l'espace entre les travées osseuses.

Chez les souris normales, le traitement n'induit pas de modification significative.

- Une augmentation de la formation de l'os trabéculaire avec:
 - o Une augmentation de l'apposition minérale osseuse trabéculaire provenant d'une augmentation de l'activité des ostéoblastes lors de la phase de formation osseuse. Cette apposition minérale osseuse n'est pas modifiée significativement chez les souris normales,
 - o Pas de modification significative du rapport Ca/P induisant une homéostasie osseuse et un statut nutritionnel normal,
 - o Pas de modification significative du taux sérique d'IGF-1. Chez les souris normales, ce taux est significativement diminué lors du traitement et atteint le même niveau que les souris F508del traitées et non traitées,
 - o Une augmentation importante du taux sérique de 17β -œstradiol. Les souris normales n'ont pas de modification significative du taux sérique de 17β -œstradiol.

Ainsi, nos résultats montrent clairement que le miglustat normalise la masse osseuse et augmente le taux de formation osseuse dans le modèle murin CF homozygote pour la mutation F508del-CFTR. Cela suggère un rôle potentiel thérapeutique du miglustat sur la maladie osseuse chez les patients porteurs de cette mutation F508del-CFTR.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Nous avons montré que la mutation homozygote F508del du gène *Cftr* induit un phénotype sévère d'ostéopénie, chez des jeunes souris âgées de 6 semaines, mâles et femelles avec : une diminution de la densité minérale et de la masse osseuse ainsi qu'une altération de l'architecture osseuse. Celle-ci se traduit par une diminution du nombre et de l'épaisseur des travées et une augmentation de l'espace entre les travées, par rapport aux souris normales. Ce phénotype est associé à une diminution du taux de formation osseuse à tous les âges (6 semaines = pré-pubertaire, 10 semaines = pubertaire et 14 semaines = jeune adulte) des souris F508del mâles et femelles. Nos données sont différentes de celles préalablement décrites sur l'étude des souris KO-CFTR (CFTR^{-/-}) corrigées au niveau digestif, à savoir : une réduction de la formation osseuse chez les souris KO-CFTR femelles et une augmentation de la formation osseuse chez les souris mâles (Pashuck *et al.*, 2009).

A 14 semaines (jeune adulte), nous observons une diminution persistante de la formation osseuse et du volume osseux chez les souris F508del mâles. Paradis *et al.*, ont fait les mêmes observations : une réduction du volume osseux au niveau du fémur chez la souris adulte bien qu'il n'y ait aucune différence de poids, de taille, de densité minérale osseuse et de nombre d'ostéoclastes (Paradis *et al.*, 2010). Chez les patients CF, trois études cliniques ont montré le même phénotype, dans les deux sexes : une densité minérale osseuse et un volume osseux trabéculaire diminués (Haworth *et al.*, 1999 ; Elkin *et al.*, 2002 ; Grey *et al.*, 2008).

Comme l'avait déjà observé les travaux Paradis *et al.*, aucune modification significative du nombre d'ostéoclastes n'est observée chez les souris F508del à 6 et 14 semaines (Paradis *et al.*, 2010). La mutation F508del-CFTR n'induirait donc pas une augmentation du nombre d'ostéoclastes.

Par contre, au stade pubertaire, dans les 2 sexes, le nombre d'ostéoclastes est augmenté chez les souris F508del par rapport aux souris normales. Elles auraient un retard de croissance par rapport aux souris normales. En effet, lors de la croissance osseuse, la formation est plus importante que la résorption osseuse : ceci permet une bonne acquisition de la masse osseuse. La résorption osseuse reste essentielle : elle intervient dans l'érosion osseuse dans le processus de remodelage mais aussi dans la résorption du cartilage au niveau de l'ossification endochondrale. C'est ce phénomène que nous observons chez les souris F508del à 10 semaines alors qu'il a disparu chez les souris normales. Il est visible aussi chez toutes les souris, à 6 semaines : une plaque de croissance reflétant une ossification endochondrale importante alors qu'elle est quasi inexistante chez toutes les souris jeunes adultes. Des données cliniques complètent nos observations : elles indiquent une augmentation des taux des marqueurs de résorption osseux chez les patients CF, homozygotes pour la mutation F508del-CFTR (Haworth *et al.*, 1999) et ces différences sont plus marquées chez l'homme par rapport à la femme (King *et al.*, 2005), comme nous l'avons observé dans notre modèle murin F508del.

Des études cliniques ont également montré un lien entre la diminution de la densité minérale osseuse et les altération de la résorption osseuse ainsi que des taux des marqueurs osseux lors d'une infection pulmonaire avec une inflammation systémique (Ionescu *et al.*, 2000 ; Aris *et al.*, 2000). Plus récemment, une corrélation positive a été faite entre le nombre d'ostéoclastes, les taux sériques du TNF α et d'ostéocalcine, chez les patients CF (Shead *et al.*, 2010).

Malgré toutes ces observations chez les patients CF, les souris F508del n'ont pas d'inflammation pulmonaire et systémique (Van Doorninck *et al.*, 1995) bien que Wilke *et al.* indiquent, récemment, une inflammation pulmonaire modérée chez la souris F508del mature adulte (14-20 semaines ; Wilke *et al.*, 2011). Les souris F508del ne présentent PAS des taux sériques d'ostéocalcine de TNF α et d'IL-6 significativement différents par rapport aux souris normales. Ainsi, l'inflammation ne peut être la cause de la modification de l'activité des cellules osseuses dans notre modèle. Les souris F508del sont par conséquent, un bon modèle pour l'étude de l'étiologie de l'ostéopénie précoce rencontrée chez les patients CF.

Chez l'homme, les nouveaux nés CF sont plus petits en taille, et ont un poids corporel plus faible que leurs homologues sains (Festini *et al.*, 2005). Ils ont aussi un taux sérique d'IGF-1 faible. L'IGF-1 est bien connue pour réguler la croissance osseuse ainsi que la densité minérale osseuse (Yakar *et al.*, 2002). Le défaut d'IGF-1 sérique est associé à un retard de croissance chez l'homme (Switzer *et al.*, 2009), chez la souris KO-CFTR (Rogan *et al.*, 2010) et chez le cochon CFTR^{-F508del} (Rogan *et al.*, 2010). Ainsi le faible taux d'IGF-1 est un indicateur d'une faible densité minérale osseuse, chez l'homme (Gordon *et al.*, 2006) mais aussi chez la souris KO-CFTR (Rosenberg *et al.*, 2006). Comme rapporté dans ces études, les souris F508del ont un faible taux sérique d'IGF-1 à 6, 10 et 14 semaines. Toutes ces données montrent que la mutation F508del-CFTR est associée à un faible taux d'IGF-1 qui peut être la cause de la réduction de la formation osseuse.

Les souris F508del ont des valeurs du rapport Calcium/Phosphate (Ca/P), dans l'os trabéculaire et cortical, comparables aux souris normales. On peut donc supposer que la teneur de l'os en calcium n'est pas modifiée par la mutation F508del-CFTR. Ces données sont importantes ; le calcium étant essentiel pour avoir une bonne masse osseuse. Ces mêmes observations ont été faites chez l'homme : le pourcentage d'absorption du calcium a été montré similaire entre les patients CF et les personnes saines (Hilman *et al.*, 2008).

Tous nos résultats, obtenus à l'aide du modèle murin F508del, génèrent l'hypothèse que la masse osseuse diminuée peut être induite par la mutation F508del-CFTR. Ainsi nos données montrent un rôle important de la protéine CFTR normale dans le maintien de la masse osseuse.

Nos études, *in vitro*, confirme la présence d'un canal fonctionnel CFTR au niveau de l'ostéoblaste normal (Shead *et al.*, 2007 ; Bronckers *et al.*, 2010 ; Le Heron *et al.*, 2010), par la présence d'un flux chlorure dépendant de CFTR. Par contre, ce flux chlorure est pratiquement absent

dans notre modèle de culture primaire d'ostéoblastes humains CF homozygote et hétérozygote pour la mutation F508del-CFTR. Ces études montrent aussi une diminution de la sécrétion d'OPG par rapport aux cellules normales. Or, les patients CF ont un faible taux sérique d'OPG (Shead *et al.*, 2010) qui pourrait expliquer une diminution de la densité minérale osseuse avec une augmentation de la résorption osseuse (King *et al.*, 2005 ; Sermet-Gaudelus *et al.*, 2009 ; Shead *et al.*, 2010). Cela suggère que la protéine CFTR interviendrait dans la régulation de l'activité ostéoblastique.

Tous les résultats de nos études montrent un effet de la mutation F508del-CFTR dans l'activité ostéoblastique qui est associée à une diminution de la formation osseuse et de la masse osseuse.

Après avoir mise en évidence que la mutation F508del-CFTR, chez la souris, induit une sévère ostéopénie, nous avons voulu analyser l'effet de l'administration orale du miglustat (un activateur du canal chlorure F508del-CFTR) sur le phénotype osseux, chez les souris F508del. Pour cela nous avons administré le miglustat, par gavage journalier, à 120 mg/kg/jour, pendant 4 semaines, chez des souris F508del mâles âgées de 6 semaines.

L'effet activateur du miglustat sur la fonction chlorure de la protéine F508del-CFTR, a été, au préalable, observé au niveau de la muqueuse nasale des souris F508del (Noël *et al.*, 2008). Chez les souris F508del, nous avons montré que le miglustat permet une normalisation de la masse osseuse et une amélioration de la microarchitecture osseuse. De plus, en présence de miglustat, les souris F508del-CFTR ont un poids corporel augmenté de 10%, indiquant une non-toxicité du traitement. La distribution de cette molécule se fait de manière très large et dans les organes profonds tel que l'os et les poumons (Treiber *et al.*, 2007).

Le miglustat est un puissant inhibiteur des α -glucosidases (Amari and Naim, 2012). Il régule les glycosphingolipides par inhibition de la glucosylcéramide synthase (Platt *et al.*, 1994a et b). Il en résulte une accumulation de céramides. Or, les céramides jouent un rôle important dans la modulation du métabolisme osseux (Gronowitz *et al.*, 2006). Des études ont montré des taux faibles de céramide dans le plasma, les poumons et tous les organes touchés par la mucoviscidose, chez les patients adultes CF et les souris KO-CFTR (Guilbault *et al.*, 2008). Ainsi les effets positifs du miglustat, sur la masse osseuse, peuvent être médiés par la correction du déficit en céramide. Pour valider cette hypothèse, il est maintenant, nécessaire de réaliser de plus amples analyses telles que la mesure du taux de céramide dans le sérum.

Comme nous l'avons décrit dans l'étude précédente, les souris F508del présentent une diminution importante du taux sérique d'IGF-1 (Le Henaff *et al.*, 2012). Ce faible taux pourrait contribuer à la réduction du nombre et de la fonction des ostéoblastes (Yakar *et al.*, 2002 ; Kasukawa *et al.*, 2004). Bien que le taux d'IGF-1 ne soit pas significativement modifié chez les souris F508del

traitées par le miglustat, la masse osseuse est augmentée. Ceci semble indiquer qu'il n'existe pas de relation directe entre la masse osseuse et le taux sérique d'IGF-1.

De manière surprenante, les souris F508del traitées au miglustat ont un taux sérique de 17 β -œstradiol (E₂) très augmenté (par un facteur 2 à 2.5). Ce taux n'est pas significativement différent chez la souris F508del par rapport aux souris normales et chez les souris normales traitées. Le 17 β -œstradiol est une hormone importante dans le maintien de l'homéostasie osseuse. Des études précliniques et cliniques ont préalablement montré qu'une carence sérique en œstradiol induit une masse osseuse réduite et une formation osseuse diminuée (Holmdahl *et al.*, 1986 ; Chow *et al.*, 1992 ; Engdahl *et al.*, 2010). De plus, une corrélation inverse entre le taux de 17 β -œstradiol sérique et la prévalence des fractures vertébrales chez les patients CF a été montrée dans les deux sexes (Rossini *et al.*, 2004). Or, les souris F508del ne présentent pas de modification du taux d'17 β -œstradiol par rapport aux souris normales, mais elles ont une formation et une masse osseuse diminuées. Le 17 β -œstradiol ne semble pas jouer de rôle majeur dans la perte osseuse induite par la mutation F508del-CFTR. Dans des études *in vitro*, nous avons observé des effets bénéfiques du 17 β -œstradiol sur des ostéoblastes humains CF homozygotes pour la mutation F508del-CFTR : 1) une augmentation du flux chlorure dépendant du canal CFTR (précédemment montré dans cellules épithéliales bronchiques F508del-CFTR ; Fanelli *et al.*, 2008) et 2) une augmentation de la sécrétion d'OPG. Ainsi une supplémentation en œstradiol permettrait de réguler de manière positive l'activité ostéoblastique CF et induirait une ostéoprotection via une stimulation de l'expression d'OPG. De plus, il a été déjà rapporté que le 17 β -œstradiol possède une activité anti-inflammatoire par une réduction de la production d'IL-8 liée à une diminution de la translocation du facteur de transcription nucléaire NF- κ B dans les cellules épithéliales bronchiques F508del-CFTR humaines (Chotirmall *et al.*, 2010).

La voie de signalisation NF- κ B

Il est connu que chez les patients CF, le facteur nucléaire NF- κ B est transactivé par le dysfonctionnement de la protéine CFTR dans l'épithélium respiratoire (Tabary *et al.*, 2001). La protéine F508del-CFTR joue aussi un rôle dans la réponse inflammatoire en stimulant la voie NF κ B (Vij *et al.*, 2006 ; Perez *et al.*, 2007). La surexpression de la protéine CFTR normale, dans les lignées cellulaires exprimant le promoteur F508del-CFTR, induit une répression de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B (Vij *et al.*, 2009).

NF κ B est le facteur nucléaire kappa – chaîne légère – activateur de lymphocyte B. Il est exprimé de façon ubiquitaire et comprend une famille de 5 membres : p65 (Rel-A), c-Rel, Rel-B, NF κ B1 (p50/p105) et NF κ B2 (p52/p100). C'est un complexe protéique régulant la transcription de l'ADN. Ces protéines se dimérisent et sont régulées par leur interaction avec I κ B. L'activité de NF κ B est régulée par son trafic entre le cytoplasme et le noyau : dans des cellules non stimulées, NF κ B est localisé dans le cytoplasme sous la forme d'un complexe protéique avec les protéines I κ B alors qu'après stimulation, I κ B est dégradé par le protéasome et NF κ B peut transloquer dans le noyau et activer ses

gènes cibles (figure 19) (Bonizzi and Karin, 2004 ; Ghosh and Karin, 2002 ; Hayden and Ghosh, 2004).

Il est classiquement admis que le facteur NF- κ B peut être activé selon deux voies appelées la voie classique et la voie alternative.

La voie classique est activée par tous les stimuli qui affectent NF κ B, incluant RANKL et TNF α . Le complexe protéique kinase IKK est le point clé de la régulation : les composés critiques sont IKK β et le complexe NEMO/IKK γ . Ces derniers sont des cibles de la dégradation par I κ B α . Cette voie active les dimères p65/p50 ou cRel/p50. I κ B α supporte un feedback négatif qui permet une activation transitoire des gènes cibles (figure 19 ; Novack, 2011).

Dans la voie alternative, la protéine NIK (NF κ B-Inducing Kinase) permet un switch de régulation. Contrairement au complexe stable IKK, NIK est dégradée de manière constitutive par son interaction avec TRAF3. Après une stimulation à l'aide d'une cytokine spécifique, TRAF3 se lie au récepteur de cette cytokine et va être dégradée. NIK est, à ce moment-là, stabilisée et va activer IKK α . Cette dernière induit la translocation du complexe RelB/p52. Cette voie ne peut être activée que par une partie de la famille du TNF incluant RANKL mais pas TNF- α . Ceci est dû à la capacité de leur récepteur à se lier à TRAF3 (Figure 19 ; Novack, 2011).

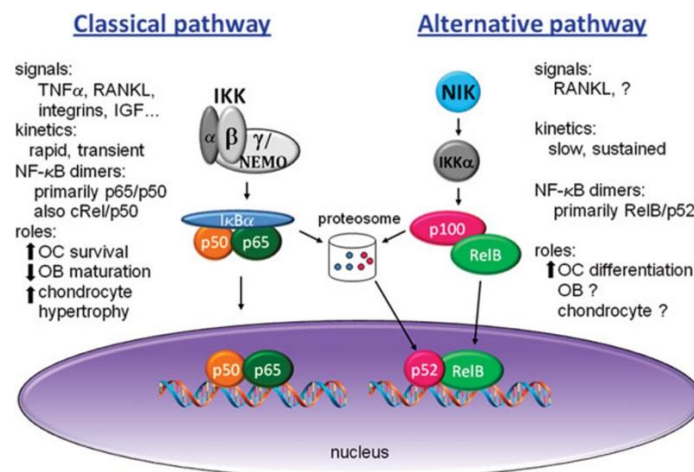


Figure 19 : les voies de signalisation via NF κ B au niveau de l'os (Novack, 2011)

Au niveau des cellules osseuses, NF κ B possède de nombreuses fonctions : la différenciation et l'activité de la majorité des cellules osseuses (les ostéoclastes, les ostéoblastes, les ostéocytes et les chondrocytes ; Novack, 2011).

L'activation de la voie NF- κ B permet la différenciation et la survie des ostéoclastes. Par contre, elle inhibe la fonction ostéoblastique. L'activation de NF- κ B augmente l'expression des gènes ostéoclastiques : TRAP, cathepsin K et OSCAR (Osteoclast associated receptor). (Krum et al., 2010). De plus, de très nombreuses études sur des cellules osseuses d'origine humaine ou sur des modèles murins ont montré que l'ostéoclaste était la cellule ciblée dans la perte osseuse au cours de l'inflammation via l'activation de la voie alternative de signalisation de NF κ B (Wong *et al.*, 1997 ; Lacey

et al., 1998 ; Guilbert *et al.*, 2002 ; Agarwal *et al.*, 2003 ; Kaneki *et al.*, 2006 ; Li *et al.*, 2007 ; Chang *et al.*, 2009 ; Krum *et al.*, 2010 ; Novack, 2011).

Plus récemment, les travaux de Chang *et al.* ont montré que NFκB est un facteur responsable de l'insuffisance de la formation osseuse dans l'ostéoporose. L'inhibition de NFκB augmente la différenciation ostéoblastique *in vitro* ainsi que la fonction ostéoblastique, *in vivo* : une masse osseuse, une formation osseuse plus importantes chez les souris IKK dominant négative (Chang *et al.*, 2009). La différenciation ostéoblastique est régulée de manière négative par la voie classique d'activation de NFκB (Novack, 2011). NFκB régule de manière négative l'activation de JNK (c-Jun N-terminal Kinase) qui stimule la transcription de protéines importantes dans la régulation ostéoblastique.

Ainsi, vu la place importante de la voie de signalisation de NFκB dans la différenciation et l'activité ostéoblastique, il serait intéressant d'étudier les effets de la dysfonction de la protéine CFTR sur cette voie de signalisation dans les cellules osseuses. De plus, d'autres facteurs, tels l'inflammation chronique, les variations des taux d'œstradiol, de PGE2, la mutation F508del-CFTR semblent être des modulateurs potentiels de la voie NF-κB (figure 20).

Chez les patients CF, la voie NFκB est hyperactivée dans les cellules épithéliales pulmonaires CF. Les travaux de Boncoeur *et al.*, ont aussi montré que la protéine CFTR contrôle la dégradation et l'activité transcriptionnelle de NFκB en réponse à un stress oxydatif (Boncoeur *et al.*, 2008). De plus, une surexpression de la protéine CFTR induit une répression de l'activité transcriptionnelle basale du promoteur NFκB (Vij *et al.*, 2009). Cela signifie que la protéine F508del-CFTR modifie l'activité de NFκB (figure 20).

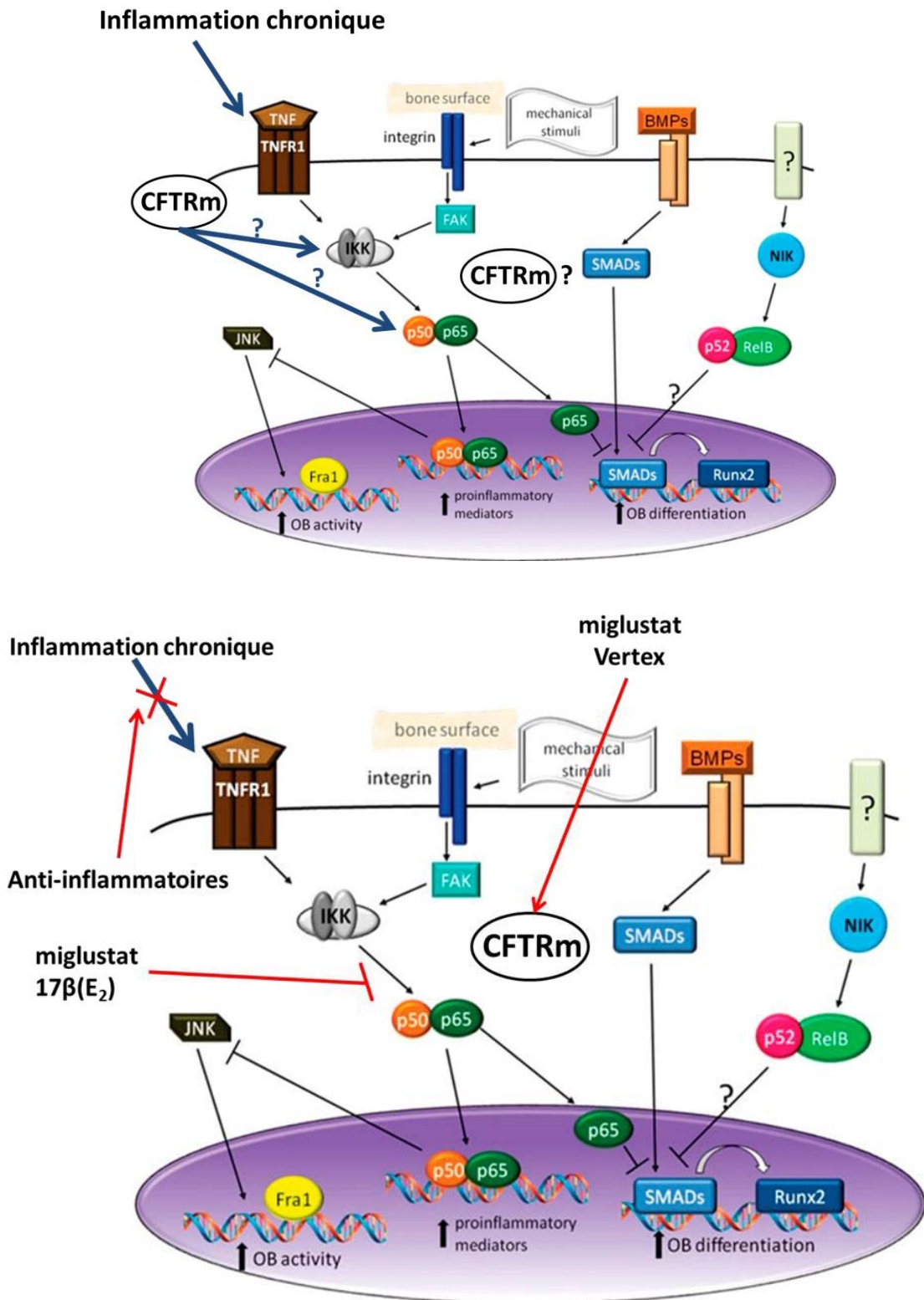


Figure 20 : Facteurs CF pouvant moduler NF-κB (adapté à partir de Novack DV, 2011)

Nos résultats ont montré que les ostéoblastes humains expriment la protéine CFTR, possèdent un flux chlorure dépendant du canal CFTR et que la mutation F508del-CFTR induit des anomalies du flux chlorure dépendant de CFTR et une faible production d'OPG. Il est donc possible que le canal CFTR soit impliqué dans la différenciation et l'activité ostéoblastique. Des études complémentaires, *in vitro*,

sur des cultures primaires humaines (homozygotes pour la mutation F508del-CFTR) et murines (souris F508del), sont donc nécessaires pour mieux appréhender le rôle de la mutation F508del-CFTR dans la voie de signalisation NFκB et son impact dans la régulation de la différenciation et l'activité de l'ostéoblaste. Il serait aussi intéressant d'analyser les effets de molécules permettant de normaliser la fonction chlorure de la protéine F508del-CFTR et d'en analyser la répercussion sur la voie de signalisation NFκB. Ces molécules, en cours d'étude, pourraient être le miglustat (normalisation de la masse osseuse chez les souris F508del), le VRT532 et le VRT534 (molécules en cours d'étude dans les Laboratoires Vertex - USA) et le VX-809 couplé au VX770 (des molécules des Laboratoires Vertex, en cours d'essai clinique de phase III chez les patients homozygotes pour la mutation F508del-CFTR).

Il est bien connu que les patients CF ont une inflammation pulmonaire chronique et ont des taux sériques élevés de cytokines IL-1β, IL-6 et TNF-α (Vij *et al.*, 2006). Ainsi, des études, *in vitro*, en présence ou en absence de ces cytokines sur des ostéoblastes primaires CF pourrait nous permettre de comprendre l'influence de l'inflammation sur l'activité des ostéoblastes primaires humains et murins CF. Ces mêmes études peuvent être complétées par l'étude de l'effet de molécules correctrices et potentiatrices de la protéine F508del-CFTR.

Nous avons observé, à partir d'ostéoblastes primaires humains CF, en culture, un effet du 17β-œstradiol : une restauration partielle du flux chlorure dépendant du canal CFTR et une augmentation de la sécrétion d'OPG. Il a été montré que l'œstradiol diminue la translocation de NFκB dans les cellules bronchiques humaines CF (Chotirmall *et al.*, 2010) et que l'œstradiol augmente la sécrétion de l'OPG dans les ostéoblastes humains. D'où cette question : L'œstradiol agit-elle sur la voie classique NFκB dans les ostéoblastes CF et modifie-t-elle l'expression de gènes ostéoblastiques (collagène de type I, ostéocalcine, Phosphatase Alcaline, Runx2, osterix) ?

L'étude de ces mécanismes moléculaires permettra de mieux comprendre le rôle de la mutation F508del-CFTR dans l'activité ostéoblastique et d'en corriger les effets afin de proposer de futurs traitements dans la maladie osseuse chez les patients CF.

PUBLICATIONS



European Calcified Tissue Society

ECTS New Investigator Award 2012

THIS IS TO CERTIFY THAT

Carole Le Henaff

HAS BEEN AWARDED AN ECTS NEW INVESTIGATOR AWARD IN RECOGNITION OF OUTSTANDING WORK

PRESENTED AT ECTS 2012 STOCKHOLM: 39TH ANNUAL CONGRESS

19-23 MAY 2012, STOCKHOLM, SWEDEN

Tim Arnett
ECTS Secretary

Pierre Marie
ECTS Grants Committee Chair

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Publications

- **Le Henaff C., Gimenez A, Haÿ E, Marty C, Marie P, Jacquot J.** The F508del mutation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene impacts bone formation. *Am J Pathol.* 2012 May;180(5):2068-75.
- **Gimenez A., Le Henaff C., Norez C., Guillaume C., Ravoninjatovo B., Laurent-Maquin D., Becq F. and Jacquot J.** Deficit of osteoprotegerin release by osteoblasts from a patient with cystic fibrosis *Eur Respir J.* 2012 Mar;39(3):780-1
- **Le Henaff C., Haÿ E., Velard F., Marty C., Morand O., Marie PJ, Jacquot J.** Increase of bone mass by miglustat : support for the use of miglustat therapy in cystic fibrosis
Soumis pour publication
- **Le Henaff C., Tabary O., Gimenez-Maitre A., Barthe F., Sermet-Gaudelus I. and Jacquot J.** Cystic fibrosis – related bone disease : Low osteoprotegerin production in primary osteoblasts from a cystic fibrosis patient with the homozygote F508del-CFTR mutation
Manuscrit en cours de préparation

Communications orales dans des congrès internationaux et nationaux

- **The F508del mutation in the Cfr gene results in decreased bone formation and bone mass.**
C. Le Henaff, A. Gimenez, E. Haÿ, C. Marty, P.J. Marie, J. Jacquot.
ECTS 2012, Stockholm, 19-23 mai 2012, New investigator awars
- **The F508del mutation in the Cfr gene impacts bone formation in mice.**
C. Le Henaff, A. Gimenez, E. Haÿ, C. Marty, P.J. Marie, J. Jacquot.
5th European CF Young Investigator Meeting, Paris, 25-27 avril 2012
- **CFTR : engaging and therapeutic target in osteoporosis**
C. Le Henaff, A. Gimenez, E. Hay, C. Marty, P.J. Marie et J. Jacquot
ECTS PhD Training, Ljubjana, Slovenia, 1-4 september 2011
- **The F508del mutation in the CFTR chloride channel causes severe bone loss associated with bone formation in mice**
C. Le Henaff, A. Gimenez, E. Hay, C. Marty, P.J. Marie et J. Jacquot
5th European CF Young Investigator Meeting, Lille, 23-26 august 2011

- **La mutation F508del de la protéine CFTR induit une perte osseuse associée à une diminution de la formation osseuse**
C. Le Henaff, A. Gimenez, E. Hay, C. Marty, P.J. Marie et J. Jacquot
13^{èmes} journées françaises de biologie des tissus minéralisés, Paris, 25-27 mai 2011
- **La mutation F508del de la protéine CFTR induit une perte osseuse associée à une diminution de la formation osseuse**
C. Le Henaff, A. Gimenez, E. Hay, C. Marty, P.J. Marie et J. Jacquot
Journée des jeunes chercheurs de l'IFR53, Reims, 20 mai 2011
- **Severe bone loss associated with bone formation in F508del-CFTR mice**
C. Le Henaff, A. Gimenez, E. Hay, C. Marty, P.J. Marie et J. Jacquot
3rd joint Meeting of the European Calcified Tissue Society and the International Bone and mineral Society, Athens, 7-11 may 2011
(oral presentation poster in the new investigator session)

Posters

- **The F508del mutation in the Cfr gene impacts bone formation in mice.**
C. Le Henaff, A. Gimenez, E. Haÿ, C. Marty, P.J. Marie, J. Jacquot
13ème colloque des jeunes chercheurs, VLM, Paris, 24 avril 2012
- **Cystic fibrosis related bone disease: F508del CFTR reduces the rate of bone formation and osteoprotegerin production**
C. Le Henaff, A. Gimenez, E. Haÿ, C. Marty, P.J. Marie, and J. Jacquot.
P2T, Dijon, 4-6 avril 2012
- **Cystic fibrosis related bone disease: F508del CFTR reduces the rate of bone formation and osteoprotegerin production**
C. Le Henaff, A. Gimenez, E. Haÿ, C. Marty, P.J. Marie, and J. Jacquot.
European Cystic Fibrosis Society, Sainte Maxime, 28 mars–1 avril 2012
- **The F508del mutation in the CFTR chloride channel causes severe bone loss associated with bone formation in mice**
C. Le Henaff, A. Gimenez, E. Hay, C. Marty, P.J. Marie et J. Jacquot
5th European CF Young Investigator Meeting, Lille, 23-26 august 2011
- **Severe bone loss associated with bone formation in F508del-CFTR mice**
C. Le Henaff, A. Gimenez, E. Hay, C. Marty, P.J. Marie et J. Jacquot
3rd joint Meeting of the European Calcified Tissue Society and the International Bone and mineral Society, Athens, 7-11 may 2011

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES hors thèse

Publications

- **Van de Veire S, Stalmans I, Heindryckx F, Oura H, Tijeras-Raballand A, Schmidt T, Loges S, Albrecht I, Jonckx B, Vinckier S, Van Steenkiste C, Tugues S, Rolny C, De Mol M, Dettori D, Hainaud P, Coenegrachts L, Contreres JO, Van Bergen T, Cuervo H, Xiao WH, Le Henaff C, Buyschaert I, Kharabi Masouleh B, Geerts A, Schomber T, Bonnin P, Lambert V, Haustraete J, Zacchigna S, Rakic JM, Jiménez W, Noël A, Giacca M, Colle I, Foidart JM, Tobelem G, Morales-Ruiz M, Vilar J, Maxwell P, Viores SA, Carmeliet G, Dewerchin M, Claesson-Welsh L, Dupuy E, Van Vlierberghe H, Christofori G, Mazzone M, Detmar M, Collen D, Carmeliet P.** Further pharmacological and genetic evidence for the efficacy of PIGF inhibition in cancer and eye disease. *Cell*. 2010, 141, 178-90.
- **Tijeras-Raballand A, Hainaud-Hakim P, Contreres JO, Gest C, Le Henaff C, Levy BI, Pocard M, Soria C, Dupuy E.** Rosuvastatin counteracts vessel arterialisatation and sinusoid capillarisation, reduces tumour growth, and prolongs survival in murine hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol Res Pract*. 2010, 2010, 640797.
- **Choveau FS, Rodriguez N, Abderemane Ali F, Labro AJ, Rose T, Dahimène S, Boudin H, Le Henaff C, Escande D, Snyders DJ, Charpentier F, Mérot J, Baró I, Loussouarn G.** KCNQ1 channels voltage dependence through a voltage-dependent binding of the S4-S5 linker to the pore domain. *J Biol Chem*. 2011, 286, 707-16.
- **Eveno C, Le Henaff C, Audollent R, Soyer P, Rampanou A, Nemeth J, Brouland JP, Dupuy E, Pocard M, Bonnin P.** Tumor and non-tumor liver angiogenesis is traced and evaluated by hepatic arterial ultrasound in murine models. *Ultrasound Med Biol*. 2012, 38, 1195-204.

Posters

- **La VE-Cadherine dans l'inflammation et le cancer.**
Mannic T., Contreres JO., Le Henaff C., Vitiécoq O., Dupuy E., Remy C., Tobelem G., Huber P., Vilgrain J.
Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire, 2 & 3 avril 2009, Nancy.
- **Rôle de l'axe PIGF/VEGFR-1 dans le remodelage vasculaire tumoral *in vivo*: Modèle de carcinome hépatocellulaire (HCC) murin.**
Annemilaï Tijeras-Raballand, Carole Le Hénaff, Jean-Olivier Contrerès, Patricia Hainaud-Hakim, José Vilar, Philippe Bonnin, Jean-Sébastien Silvestre, Bernard Lévy, Gérard Tobelem et Evelyne Dupuy.
Société Française d'Angiogenèse, 28 & 29 novembre 2008, Chantilly.
- **L'axe PIGF/VEGFR-1 induit l'expression de Dll4, Notch4 activé et éphrine B2 dans les cellules endothéliales *in vitro***
Annemilaï Tijeras-Raballand, Jean-Olivier Contrerès, Patricia Hainaud-Hakim Carole Le Hénaff, Gérard Tobelem et Evelyne Dupuy.
Société Française d'Angiogenèse, 28 & 29 novembre 2008, Chantilly.

Abstracts :

- **Operation of a voltage-dependent channel by its S4-S5 linker.**
CHOVEAU F., DAHIMENE D., LE HENAFF C., MEROT J., ESCANDE D., BARÓ I., LOUSSOUARN G.
Biophysical J., 883-Plat, 2007.
- **Voltage dependent channels are ligand-gated channels inhibited by the S4-S5 linker.**
CHOVEAU F., DAHIMENE D., LE HENAFF C., MEROT J., ESCANDE D., BARÓ I., LOUSSOUARN G.
17ème colloque de l'association « canaux ioniques », Septembre 2006, Giens.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Abian O, Alfonso P, Velazquez-Campoy A, Giraldo P, Pocovi M, Sancho J.** Therapeutic strategies for Gaucher disease: miglustat (NB-DNJ) as a pharmacological chaperone for glucocerebrosidase and the different thermostability of velaglucerase alfa and imiglucerase. *Mol Pharm.* 2011 Dec 5;8(6):2390-7
- Accurso FJ, Rowe SM, Clancy JP, Boyle MP, Dunitz JM, Durie PR, Sagel SD, Hornick DB, Konstan MW, Donaldson SH, Moss RB, Pilewski JM, Rubenstein RC, Uluer AZ, Aitken ML, Freedman SD, Rose LM, Mayer-Hamblett N, Dong Q, Zha J, Stone AJ, Olson ER, Ordoñez CL, Campbell PW, Ashlock MA, Ramsey BW.** Effect of VX-770 in persons with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation. *N Engl J Med.* 2010 Nov 18;363(21):1991-2003.
- Adolph KW, Bornstein P.** The human thrombospondin 3 gene: analysis of transcription initiation and an alternatively spliced transcript. *Mol Cell Biol Res Commun.* 1999 Jul;2(1):47-52.
- Agarwal S, Long P, Seyedain A, Piesco N, Shree A, Gassner R.** A central role for the nuclear factor-kappaB pathway in anti-inflammatory and proinflammatory actions of mechanical strain. *FASEB J.* 2003 May;17(8):899-901.
- Aguirre JI, Plotkin LI, Stewart SA, Weinstein RS, Parfitt AM, Manolagas SC, Bellido T.** Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *J Bone Miner Res.* 2006 Apr;21(4):605-15.
- Aleksandrov AA, Aleksandrov L, Riordan JR.** Nucleoside triphosphate pentose ring impact on CFTR gating and hydrolysis. *FEBS Lett.* 2002 May 8;518(1-3):183-8.(a)
- Aleksandrov L, Aleksandrov AA, Chang XB, Riordan JR.** The First Nucleotide Binding Domain of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Is a Site of Stable Nucleotide Interaction, whereas the Second Is a Site of Rapid Turnover. *J Biol Chem.* 2002 May 3;277(18):15419-25. (b)
- Aleksandrov AA, Aleksandrov LA, Riordan JR.** CFTR (ABCC7) is a hydrolyzable-ligand-gated channel. *Pflugers Arch.* 2007 Feb;453(5):693-702.
- Ameen N, Silvis M, Bradbury NA.** Endocytic trafficking of CFTR in health and disease. *J Cyst Fibros.* 2007 Jan;6(1):1-14.
- Amiri M, Naim HY.** Miglustat-induced intestinal carbohydrate malabsorption is due to the inhibition of α -glucosidases, but not β -galactosidases. *J Inherit Metab Dis.* 2012 Sep 14.
- Andersen DH.** Cystic fibrosis of the pancreas, vitamin A deficiency and bronchiectasis. *J Pediatr* 1939; 15:763-771.
- Andersen DH, Hodges RG.** Celiac syndrome; genetics of cystic fibrosis of the pancreas, with a consideration of etiology. *Am J Dis Child.* 1946 Jul;72:62-80.
- Andersen DH.** The present diagnosis and therapy of cystic fibrosis of the pancreas. *Proc R Soc Med.* 1949 Jan;42(1):25-32.
- Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC, Smith AE, Welsh MJ.** Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science.* 1991 Jul 12;253(5016):202-5.
- Andersson C, Roomans GM.** Activation of deltaF508 CFTR in a cystic fibrosis respiratory epithelial cell line by 4-phenylbutyrate, genistein and CPX. *Eur Respir J.* 2000 May;15(5):937-41.
- Aris RM, Neuringer IP, Weiner MA, Egan TM, Ontjes D.** Severe osteoporosis before and after lung transplantation. *Chest.* 1996 May;109(5):1176-83.
- Aris RM, Renner JB, Winders AD, Buell HE, Riggs DB, Lester GE, Ontjes DA.** Increased rate of fractures and severe kyphosis: sequelae of living into adulthood with cystic fibrosis. *Ann Intern Med.* 1998 Feb 1;128(3):186-93.
- Aris RM, Lester GE, Dingman S, Ontjes DA.** Altered calcium homeostasis in adults with cystic fibrosis. *Osteoporos Int.* 1999;10(2):102-8.
- Aris RM, Stephens AR, Ontjes DA, Denene Blackwood A, Lark RK, Hensler MB, Neuringer IP, Lester GE.** Adverse alterations in bone metabolism are associated with lung infection in adults with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Nov;162(5):1674-8.
- Aris RM, Ontjes DA, Buell HE, Blackwood AD, Lark RK, Caminiti M, Brown SA, Renner JB, Chalermkulrat W, Lester GE.** Abnormal bone turnover in cystic fibrosis adults. *Osteoporos Int.* 2002;13(2):151-7.

- Aris RM, Lester GE, Caminiti M, Blackwood AD, Hensler M, Lark RK, Hecker TM, Renner JB, Guillen U, Brown SA, Neuringer IP, Chalermkulrat W, Ontjes DA.** Efficacy of alendronate in adults with cystic fibrosis with low bone density. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004 Jan 1;169(1):77-82.
- Aris RM, Merkel PA, Bachrach LK, Borowitz DS, Boyle MP, Elkin SL, Guise TA, Hardin DS, Haworth CS, Holick MF, Joseph PM, O'Brien K, Tullis E, Watts NB, White TB.** Guide to bone health and disease in cystic fibrosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Mar;90(3):1888-96.
- Ballester Y, Hernandez MI, Rojo P, Manzanares J, Nebreda V, Carbajosa H, Infante E, Baro M.** Hyponatremic dehydration as a presentation of cystic fibrosis. *Pediatr Emerg Care.* 2006 Nov;22(11):725-7.
- Baron R, Rawadi G.** Targeting the Wnt/beta-catenin pathway to regulate bone formation in the adult skeleton. *Endocrinology.* 2007 Jun;148(6):2635-43.
- Baxter PS, Taylor CJ, Worthy E.** Diagnosis of cystic fibrosis. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1988 Jan 30;296(6618):355-6.
- Bear CE, Li CH, Kartner N, Bridges RJ, Jensen TJ, Ramjeesingh M, Riordan JR.** Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell.* 1992 Feb 21;68(4):809-18.
- Bedwell DM, Kaenjak A, Benos DJ, Bebek Z, Bubien JK, Hong J, Tousson A, Clancy JP, Sorscher EJ.** Suppression of a CFTR premature stop mutation in a bronchial epithelial cell line. *Nat Med.* 1997 Nov;3(11):1280-4.
- Bell SC, Bowerman AM, Nixon LE, Macdonald IA, Elborn JS, Shale DJ.** Metabolic and inflammatory responses to pulmonary exacerbation in adults with cystic fibrosis. *Eur J Clin Invest.* 2000 Jun;30(6):553-9.
- Bellon G, Michel-Calemard L, Thouvenot D, Jagneaux V, Poitevin F, Malcus C, Accart N, Layani MP, Aymard M, Bernon H, Bienvenu J, Courtney M, Döring G, Gilly B, Gilly R, Lamy D, Levrey H, Morel Y, Paulin C, Perraud F, Rodillon L, Sené C, So S, Touraine-Moulin F, Schatz C, Pavirani A** Aerosol administration of a recombinant adenovirus expressing CFTR to cystic fibrosis patients: a phase I clinical trial. *Hum Gene Ther.* 1997 Jan 1;8(1):15-25.
- Bertrand CA, Frizzell RA.** The role of regulated CFTR trafficking in epithelial secretion. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003 Jul;285(1):C1-18.
- Bianchi ML, Romano G, Saraifoger S, Costantini D, Limonta C, Colombo C.** BMD and body composition in children and young patients affected by cystic fibrosis. *J Bone Miner Res.* 2006 Mar;21(3):388-96.
- Bianchi ML.** Osteoporosis in children and adolescents. *Bone.* 2007 Oct;41(4):486-95.
- Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG.** Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. *Calcif Tissue Int.* 1991 Dec;49(6):421-6.
- Boas SR, Cleary DA, Lee PA, Orenstein DM.** Salivary testosterone levels in male adolescents with cystic fibrosis. *Pediatrics.* 1996 Mar;97(3):361-3.
- Bobadilla JL, Macek M Jr, Fine JP, Farrell PM.** Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat.* 2002 Jun;19(6):575-606.
- Boncoeur E, Roque T, Bonvin E, Saint-Criq V, Bonora M, Clement A, Tabary O, Henrion-Caude A, Jacquot J.** Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator controls lung proteasomal degradation and nuclear factor-kappaB activity in conditions of oxidative stress. *Am J Pathol.* 2008 May;172(5):1184-94.
- Bonewald LF.** Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Nov;1116:281-90.
- Bonewald LF.** The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res.* 2011 Feb;26(2):229-38.
- Bonizzi G, Karin M.** The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 2004 Jun;25(6):280-8.
- Boucher RC.** Airway surface dehydration in cystic fibrosis: pathogenesis and therapy. *Annu Rev Med.* 2007;58:157-70.
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL.** Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003 May 15;423(6937):337-42.
- Bronckers A, Kalogeraki L, Jorna HJ, Wilke M, Bervoets TJ, Lyaruu DM, Zandieh-Doulabi B, Denbesten P, de Jonge H.** The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) is expressed in maturation stage ameloblasts, odontoblasts and bone cells. *Bone.* 2010 Apr;46(4):1188-96.

- Buntain HM, Greer RM, Schluter PJ, Wong JC, Batch JA, Potter JM, Lewindon PJ, Powell E, Wainwright CE, Bell SC.** Bone mineral density in Australian children, adolescents and adults with cystic fibrosis: a controlled cross sectional study. *Thorax*. 2004 Feb;59(2):149-55.
- Burger EH, Klein-Nulend J.** Mechanotransduction in bone--role of the lacuno-canalicular network. *FASEB J*. 1999;13 Suppl:S101-12.
- Burghardt B, Elkaer ML, Kwon TH, Rácz GZ, Varga G, Steward MC, Nielsen S.** Distribution of aquaporin water channels AQP1 and AQP5 in the ductal system of the human pancreas. *Gut*. 2003 Jul;52(7):1008-16.
- Busch R.** On the history of cystic fibrosis. *Acta Univ Carol Med (Praha)*. 1990;36(1-4):13-5.
- Canalis E, Economides AN, Gazzero E.** Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev*. 2003 Apr;24(2):218-35.
- Carron JA, Walsh CA, Fraser WD, Gallagher JA.** Thrombospondin promotes resorption by osteoclasts in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995 Aug 24;213(3):1017-25.
- Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T.** Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem*. 2003 Nov;253(1-2):269-85.
- Chang J, Wang Z, Tang E, Fan Z, McCauley L, Franceschi R, Guan K, Krebsbach PH, Wang CY.** Inhibition of osteoblastic bone formation by nuclear factor-kappaB. *Nat Med*. 2009 Jun;15(6):682-9.
- Chapman I, Greville H, Ebeling PR, King SJ, Kotsimbos T, Nugent P, Player R, Topliss DJ, Warner J, Wilson JW.** Intravenous zoledronate improves bone density in adults with cystic fibrosis (CF). *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009 Jun;70(6):838-46.
- Chen JH, Stoltz DA, Karp PH, Ernst SE, Pezzulo AA, Moninger TO, Rector MV, Reznikov LR, Launspach JL, Chaloner K, Zabner J, Welsh MJ.** Loss of anion transport without increased sodium absorption characterizes newborn porcine cystic fibrosis airway epithelia. *Cell*. 2010 Dec 10;143(6):911-23.
- Cheng SH, Fang SL, Zabner J, Marshall J, Piraino S, Schiavi SC, Jefferson DM, Welsh MJ, Smith AE.** Functional activation of the cystic fibrosis trafficking mutant delta F508-CFTR by overexpression. *Am J Physiol*. 1995 Apr;268(4 Pt 1):L615-24.
- Choi JY, Lee MG, Ko S, Muallem S.** Cl(-)-dependent HCO₃⁻ transport by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *JOP*. 2001 Jul;2(4 Suppl):243-6.
- Chotirmall SH, Greene CM, Oglesby IK, Thomas W, O'Neill SJ, Harvey BJ, McElvaney NG.** 17Beta-estradiol inhibits IL-8 in cystic fibrosis by up-regulating secretory leucoprotease inhibitor. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Jul 1;182(1):62-72.
- Chow J, Tobias JH, Colston KW, Chambers TJ.** Estrogen maintains trabecular bone volume in rats not only by suppression of bone resorption but also by stimulation of bone formation. *J Clin Invest*. 1992 Jan;89(1):74-8.
- Clairicia M, Poisson C, Levret M, Lenoir G, Scheinman P, Robert JJ.** [Cystic fibrosis in home care services]. *Soins Pueric Pueric*. 2004 Jun;(218):31-3.
- Clarke LL, Grubb BR, Gabriel SE, Smithies O, Koller BH, Boucher RC.** Defective epithelial chloride transport in a gene-targeted mouse model of cystic fibrosis. *Science*. 1992 Aug 21;257(5073):1125-8.
- Clancy JP, Bebök Z, Ruiz F, King C, Jones J, Walker L, Greer H, Hong J, Wing L, Macaluso M, Lyrene R, Sorscher EJ, Bedwell DM.** Evidence that systemic gentamicin suppresses premature stop mutations in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Jun;163(7):1683-92.
- Clancy JP, Rowe SM, Bebok Z, Aitken ML, Gibson R, Zeitlin P, Berclaz P, Moss R, Knowles MR, Oster RA, Mayer-Hamblett N, Ramsey B.** No detectable improvements in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by nasal aminoglycosides in patients with cystic fibrosis with stop mutations. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007 Jul;37(1):57-66.
- Clancy JP, Rowe SM, Accurso FJ, Aitken ML, Amin RS, Ashlock MA, Ballmann M, Boyle MP, Bronsveld I, Campbell PW, De Boeck K, Donaldson SH, Dorkin HL, Dunitz JM, Durie PR, Jain M, Leonard A, McCoy KS, Moss RB, Pilewski JM, Rosenbluth DB, Rubenstein RC, Schechter MS, Botfield M, Ordoñez CL, Spencer-Green GT, Vernillet L, Wisseh S, Yen K, Konstan MW.** Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Thorax*. 2012 Jan;67(1):12-8.
- Coakley RD, Grubb BR, Paradiso AM, Gatzky JT, Johnson LG, Kreda SM, O'Neal WK, Boucher RC.** Abnormal surface liquid pH regulation by cultured cystic fibrosis bronchial epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Dec 23;100(26):16083-8.

- Cohen JC, Larson JE, Killeen E, Love D, Takemaru K.** CFTR and Wnt/beta-catenin signaling in lung development. *BMC Dev Biol.* 2008 Jul 6;8:70.
- Conover CA, Johnstone EW, Turner RT, Evans GL, John Ballard FJ, Doran PM, Khosla S.** Subcutaneous administration of insulin-like growth factor (IGF)-II/IGF binding protein-2 complex stimulates bone formation and prevents loss of bone mineral density in a rat model of disuse osteoporosis. *Growth Horm IGF Res.* 2002 Jun;12(3):178-83.
- Conway SP.** Impact of lung inflammation on bone metabolism in adolescents with cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev.* 2001 Dec;2(4):324-31.
- Cox T, Lachmann R, Hollak C, Aerts J, van Weely S, Hrebíček M, Platt F, Butters T, Dwek R, Moyses C, Gow I, Elstein D, Zimran A.** Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis. *Lancet.* 2000 Apr 29;355(9214):1481-5.
- Cremer I, Dieu-Nosjean MC, Maréchal S, Dezutter-Dambuyant C, Goddard S, Adams D, Winter N, Menetrier-Caux C, Sautès-Fridman C, Fridman WH, Mueller CG.** Long-lived immature dendritic cells mediated by TRANCE-RANK interaction. *Blood.* 2002 Nov 15;100(10):3646-55.
- Crystal RG, McElvaney NG, Rosenfeld MA, Chu CS, Mastrangeli A, Hay JG, Brody SL, Jaffe HA, Eissa NT, Danel C.** Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis. *Nat Genet.* 1994 Sep;8(1):42-51.
- Cullinane DM.** The role of osteocytes in bone regulation: mineral homeostasis versus mechanoreception. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2002;2:242-244.
- D'Souza RN, Cavender A, Sunavala G, Alvarez J, Ohshima T, Kulkarni AB, MacDougall M.** Gene expression patterns of murine dentin matrix protein 1 (Dmp1) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) suggest distinct developmental functions in vivo. *J Bone Miner Res.* 1997 Dec;12(12):2040-9.
- Darling RC, Disant'Agnes PA, Perera GA, Andersen DH.** Electrolyte abnormalities of the sweat in fibrocystic disease of the pancreas. *Am J Med Sci.* 1953 Jan;225(1):67-70.
- De Crombrughe B, Lefebvre V, Nakashima K.** Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Curr Opin Cell Biol.* 2001, 13:721-727.
- Del Fattore A, Teti A, Rucci N.** Bone cells and the mechanisms of bone remodelling. *Front Biosci (Elite Ed).* 2012 Jan 1;4:2302-21.
- Delaissé JM, Engsig MT, Everts V, del Carmen Ovejero M, Ferreras M, Lund L, Vu TH, Werb Z, Winding B, Lochter A, Karsdal MA, Troen T, Kirkegaard T, Lenhard T, Heegaard AM, Neff L, Baron R, Foged NT.** Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. *Clin Chim Acta.* 2000 Feb 15;291(2):223-34.
- Demko CA, Byard PJ, Davis PB.** Gender differences in cystic fibrosis: Pseudomonas aeruginosa infection. *J Clin Epidemiol.* 1995 Aug;48(8):1041-9.
- Dempster DW, Cosman F, Parisien M, Shen V, Lindsay R.** Anabolic actions of parathyroid hormone on bone. *Endocr Rev.* 1993 Dec;14(6):690-709.
- Deneuve E, Roussey M.** Le dépistage néonatal de la mucoviscidose en France et dans le monde. Organisation, bénéfices, difficultés. État des lieux en 2006. *Journées de Techniques Avancées en Gynécologie et Obstétrique, JTA* 2007.
- Dequeker E, Stuhmann M, Morris MA, Casals T, Castellani C, Claustres M, Cuppens H, des Georges M, Ferec C, Macek M, Pignatti PF, Scheffer H, Schwartz M, Witt M, Schwarz M, Girodon E.** Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders--updated European recommendations. *Eur J Hum Genet.* 2009 Jan;17(1):51-65.
- des Georges M, Guittard C, Templin C, Altieri JP, de Carvalho C, Ramsay M, Claustres M.** WGA allows the molecular characterization of a novel large CFTR rearrangement in a black South African cystic fibrosis patient. *J Mol Diagn.* 2008 Nov;10(6):544-8.
- Deschaseaux F, Sensébé L, Heymann D.** Mechanisms of bone repair and regeneration. *Trends Mol Med.* 2009 Sep;15(9):417-29.
- Deterding RR, Lavange LM, Engels JM, Mathews DW, Coquillette SJ, Brody AS, Millard SP, Ramsey BW; for the Cystic Fibrosis Therapeutics Development Network and the Inspire 08-103 Working Group.** Phase 2 randomized safety and efficacy trial of nebulized denufosol tetrasodium in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 Aug 15;176(4):362-9.

- Devidas S, Guggino WB.** CFTR: domains, structure, and function. *J Bioenerg Biomembr.* 1997 Oct;29(5):443-51.
- Devor DC, Singh AK, Lambert LC, DeLuca A, Frizzell RA, Bridges RJ.** Bicarbonate and chloride secretion in Calu-3 human airway epithelial cells. *J Gen Physiol.* 1999 May;113(5):743-60.
- Di Sant'Agnese PE, Andersen DH.** Cystic fibrosis of the pancreas. *Prog Pediat Study.* 1948;(1 Vol.):160-76.
- Di Sant'Agnese P, Darling RC, Perara GA, Shea E.** Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. *AMA Am J Dis Child.* 1953 Nov;86(5):618-9; discussion, 619.
- Dif F, Marty C, Baudoin C, de Vernejoul MC, Levi G.** Severe osteopenia in CFTR-null mice. *Bone.* 2004 Sep;35(3):595-603.
- Divangahi M, Balghi H, Danialou G, Comtois AS, Demoule A, Ernest S, Haston C, Robert R, Hanrahan JW, Radzioch D, Petrof BJ.** Lack of CFTR in skeletal muscle predisposes to muscle wasting and diaphragm muscle pump failure in cystic fibrosis mice. *PLoS Genet.* 2009 Jul;5(7):e1000586.
- Domingo-Ribas C, Bosque-García M.** [Nasal potential difference test to diagnose cystic fibrosis]. *Arch Bronconeumol.* 2006 Jan;42(1):33-8.
- Drury D, Grey VL, Ferland G, Gundberg C, Lands LC.** Efficacy of high dose phylloquinone in correcting vitamin K deficiency in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2008 Sep;7(5):457-9.
- Durieu I, Josserand RN.** [Cystic fibrosis in 2008]. *Rev Med Interne.* 2008 Nov;29(11):901-7.
- Egan M, Flotte T, Afione S, Solow R, Zeitlin PL, Carter BJ, Guggino WB.** Defective regulation of outwardly rectifying Cl⁻ channels by protein kinase A corrected by insertion of CFTR. *Nature.* 1992 Aug 13;358(6387):581-4.
- Eggermont E, De Boeck K.** Small-intestinal abnormalities in cystic fibrosis patients. *Eur J Pediatr.* 1991 Oct;150(12):824-8.
- Eiberg H, Mohr J, Schmiegelow K, Nielsen LS, Williamson R.** Linkage relationships of paraoxonase (PON) with other markers: indication of PON-cystic fibrosis synteny. *Clin Genet.* 1985 Oct;28(4):265-71.
- Elborn JS.** How can we prevent multisystem complications of cystic fibrosis? *Semin Respir Crit Care Med.* 2007 Jun;28(3):303-11.
- Elkin SL, Fairney A, Burnett S, Kemp M, Kyd P, Burgess J, Compston JE, Hodson ME.** Vertebral deformities and low bone mineral density in adults with cystic fibrosis: a cross-sectional study. *Osteoporos Int.* 2001;12(5):366-72.
- Elkin SL, Vedi S, Bord S, Garrahan NJ, Hodson ME, Compston JE.** Histomorphometric analysis of bone biopsies from the iliac crest of adults with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Dec 1;166(11):1470-4.
- Elstein D, Hollak C, Aerts JM, van Weely S, Maas M, Cox TM, Lachmann RH, Hrebicek M, Platt FM, Butters TD, Dwek RA, Zimran A.** Sustained therapeutic effects of oral miglustat (Zavesca, N-butyldeoxynojirimycin, OGT 918) in type I Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis.* 2004;27(6):757-66.
- Engdahl C, Jochems C, Windahl SH, Börjesson AE, Ohlsson C, Carlsten H, Lagerquist MK.** Amelioration of collagen-induced arthritis and immune-associated bone loss through signaling via estrogen receptor alpha, and not estrogen receptor beta or G protein-coupled receptor 30. *Arthritis Rheum.* 2010 Feb;62(2):524-33.
- Everts V, Korper W, Jansen DC, Steinfors J, Lammerse I, Heera S, Docherty AJ, Beertsen W.** Functional heterogeneity of osteoclasts: matrix metalloproteinases participate in osteoclastic resorption of calvarial bone but not in resorption of long bone. *FASEB J.* 1999 Jul;13(10):1219-30.
- Everts V, Delaissé JM, Korper W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P, Beertsen W.** The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res.* 2002 Jan;17(1):77-90.
- Fanconi G, Uehlinger E, Knauer C.** Das coeliakiesyndrom bei angeborener zystischer pankreasfibromatose und bronchiektasien. *Wien Med Wschr* 1936; 86:753-756.
- Fanelli T, Cardone RA, Favia M, Guerra L, Zaccolo M, Monterisi S, De Santis T, Riccardi SM, Reshkin SJ, Casavola V.** Beta-oestradiol rescues DeltaF508CFTR functional expression in human cystic fibrosis airway CFBE410- cells through the up-regulation of NHERF1. *Biol Cell.* 2008 Jul;100(7):399-412.
- Farber S, Shwachman H, Maddock CL.** Pancreatic function and disease in early life. I. Pancreatic Enzyme activity and the celiac syndrome. *J Clin Invest.* 1943 Nov;22(6):827-38.

- Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, Durie PR, Legrys VA, Massie J, Parad RB, Rock MJ, Campbell PW 3rd; Cystic Fibrosis Foundation.** Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr.* 2008 Aug;153(2):S4-S14.
- Festini F, Taccetti G, Repetto T, Reali MF, Campana S, Mergni G, Marianelli L, de Martino M.** Gestational and neonatal characteristics of children with cystic fibrosis: a cohort study. *J Pediatr.* 2005 Sep;147(3):316-20.
- Finkelstein JS, Hayes A, Hunzelman JL, Wyland JJ, Lee H, Neer RM.** The effects of parathyroid hormone, alendronate, or both in men with osteoporosis. *N Engl J Med.* 2003 Sep 25;349(13):1216-26.
- Flori E, Doray B.** « Mucoviscidose [archive] » sur <http://www-ulpmed.u-strasbg.fr> [archive], Faculté de médecine de Strasbourg - Item 31 - 2006/2007,
- Fowlkes JL, Thrailkill KM, Liu L, Wahl EC, Bunn RC, Cockrell GE, Perrien DS, Aronson J, Lumpkin CK Jr.** Effects of systemic and local administration of recombinant human IGF-I (rhIGF-I) on de novo bone formation in an aged mouse model. *J Bone Miner Res.* 2006 Sep;21(9):1359-66.
- Franceschi RT, Xiao G, Jiang D, Gopalakrishnan R, Yang S, Reith E.** Multiple signaling pathways converge on the Cbfa1/Runx2 transcription factor to regulate osteoblast differentiation. *Connect Tissue Res.* 2003;44 Suppl 1:109-16.
- Frangolias DD, Paré PD, Kendler DL, Davidson AG, Wong L, Raboud J, Wilcox PG.** Role of exercise and nutrition status on bone mineral density in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2003 Dec;2(4):163-70.
- French PJ, van Doorninck JH, Peters RH, Verbeek E, Ameen NA, Marino CR, de Jonge HR, Bijman J, Scholte BJ.** A delta F508 mutation in mouse cystic fibrosis transmembrane conductance regulator results in a temperature-sensitive processing defect in vivo. *J Clin Invest.* 1996 Sep 15;98(6):1304-12.
- Funck-Brentano T, Cohen-Solal M.** Crosstalk between cartilage and bone: when bone cytokines matter. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011 Apr;22(2):91-7. doi: 10.1016/j.cytogfr.2011.04.003.
- Gadsby DC, Nairn AC.** Regulation of CFTR Cl⁻ ion channels by phosphorylation and dephosphorylation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.* 1999;33:79-106.
- Gadsby DC, Vergani P, Csanády L.** The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature.* 2006 Mar 23;440(7083):477-83.
- Gardner JC, van Bezooijen RL, Mervis B, Hamdy NA, Löwik CW, Hamersma H, Beighton P, Papapoulos SE.** Bone mineral density in sclerosteosis; affected individuals and gene carriers. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Dec;90(12):6392-5.
- Gelman MS, Kannegaard ES, Kopito RR.** A principal role for the proteasome in endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded intracellular cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem.* 2002 Apr 5;277(14):11709-14.
- Gelman MS, Kopito RR.** Cystic fibrosis: premature degradation of mutant proteins as a molecular disease mechanism. *Methods Mol Biol.* 2003;232:27-37.
- Gentsch M, Cui L, Mengos A, Chang XB, Chen JH, Riordan JR.** The PDZ-binding chloride channel ClC-3B localizes to the Golgi and associates with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-interacting PDZ proteins. *J Biol Chem.* 2003 Feb 21;278(8):6440-9.
- Ghosh S, Karin M.** Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell.* 2002 Apr;109 Suppl:S81-96.
- Gibson LE, Cooke RE.** A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics.* 1959 Mar;23(3):545-9.
- Gilbert L, He X, Farmer P, Rubin J, Drissi H, van Wijnen AJ, Lian JB, Stein GS, Nanes MS.** Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2alpha A) is inhibited by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem.* 2002 Jan 25;277(4):2695-701.
- Gimble JM, Zvonic S, Floyd ZE, Kassem M, Nuttall ME.** Playing with bone and fat. *J Cell Biochem.* 2006 May 15;24(5):1246-53.
- Gimenez-Maitre A, Le Henaff C, Norez C, Guillaume C, Ravoninjatovo B, Laurent-Maquin D, Becq F, Jacquot J.** Deficit of osteoprotegerin release by osteoblasts from a patient with cystic fibrosis. *Eur Respir J.* 2012 Mar;39(3):780-1.
- Giustina A, Mazziotti G, Canalis E.** Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton. *Endocr Rev.* 2008 Aug;29(5):535-59.

- Glass DA 2nd, Karsenty G.** In vivo analysis of Wnt signaling in bone. *Endocrinology*. 2007 Jun;148(6):2630-4.
- Glimcher MJ.** The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification. *Instr Course Lect*. 1987;36:49-69.
- Glozman R, Okiyoneda T, Mulvihill CM, Rini JM, Barriere H, Lukacs GL.** N-glycans are direct determinants of CFTR folding and stability in secretory and endocytic membrane traffic. *J Cell Biol*. 2009 Mar 23;184(6):847-62.
- Gordon CM, Binello E, LeBoff MS, Wohl ME, Rosen CJ, Colin AA.** Relationship between insulin-like growth factor I, dehydroepiandrosterone sulfate and proresorptive cytokines and bone density in cystic fibrosis. *Osteoporos Int*. 2006;17(5):783-90.
- Gore AP, Kwon SH, Stenbit AE.** A roadmap to the brittle bones of cystic fibrosis. *J Osteoporos*. 2010 Dec 16;2011:926045.
- Grasemann H, Stehling F, Brunar H, Widmann R, Laliberte TW, Molina L, Döring G, Ratjen F.** Inhalation of Moli1901 in patients with cystic fibrosis. *Chest*. 2007 May;131(5):1461-6.
- Greer RM, Buntain HM, Potter JM, Wainwright CE, Wong JC, O'Rourke PK, Francis PW, Bell SC, Batch JA.** Abnormalities of the PTH-vitamin D axis and bone turnover markers in children, adolescents and adults with cystic fibrosis: comparison with healthy controls. *Osteoporos Int*. 2003 Jun;14(5):404-11.
- Grey AB, Ames RW, Matthews RD, Reid IR.** Bone mineral density and body composition in adult patients with cystic fibrosis. *Thorax*. 1993 Jun;48(6):589-93.
- Grey V, Atkinson S, Drury D, Casey L, Ferland G, Gundberg C, Lands LC.** Prevalence of low bone mass and deficiencies of vitamins D and K in pediatric patients with cystic fibrosis from 3 Canadian centers. *Pediatrics*. 2008 Nov;122(5):1014-20.
- Gronowitz E, Mellström D, Strandvik B.** Serum phospholipid fatty acid pattern is associated with bone mineral density in children, but not adults, with cystic fibrosis. *Br J Nutr*. 2006 Jun;95(6):1159-65.
- Grosskopf C, Farriaux JP, Vidailhet M, Briard ML, Navarro J, Turck D, Travert G, Belot V, Bloch J, Roussel P.** [National neonatal screening program for cystic fibrosis: management and organization]. *Arch Pediatr*. 2003 Sep;10 Suppl 2:364s-369s.
- Grubb BR, Boucher RC.** Pathophysiology of gene-targeted mouse models for cystic fibrosis. *Physiol Rev*. 1999 Jan;79(1 Suppl):S193-214.
- Guilbault C, Saeed Z, Downey GP, Radzioch D.** Cystic fibrosis mouse models. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007 Jan;36(1):1-7.
- Guilbault C, De Sanctis JB, Wojewodka G, Saeed Z, Lachance C, Skinner TA, Vilela RM, Kubow S, Lands LC, Hajduch M, Matouk E, Radzioch D.** Fenretinide corrects newly found ceramide deficiency in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008 Jan;38(1):47-56.
- Grzesik WJ, Robey PG.** Bone matrix RGD glycoproteins: immunolocalization and interaction with human primary osteoblastic bone cells in vitro. *J Bone Miner Res*. 1994 Apr;9(4):487-96.
- Haardt M, Benharouga M, Lechardeur D, Kartner N, Lukacs GL.** C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation. *J Biol Chem*. 1999 Jul 30;274(31):21873-7.
- Hamann S.** Molecular mechanisms of water transport in the eye. *Int Rev Cytol*. 2002;215:395-431.
- Hankenson KD, Bain SD, Kyriakides TR, Smith EA, Goldstein SA, Bornstein P.** Increased marrow-derived osteoprogenitor cells and endosteal bone formation in mice lacking thrombospondin 2. *J Bone Miner Res*. 2000 May;15(5):851-62.
- Hanrahan JW, Kone Z, Mathews CJ, Luo J, Jia Y, Linsdell P.** Patch-clamp studies of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Methods Enzymol*. 1998;293:169-94.
- Harada S, Rodan GA.** Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*. 2003 May 15;423(6937):349-55.
- Hardin DS, Rice J, Ahn C, Ferkol T, Howenstine M, Spears S, Prestidge C, Seilheimer DK, Shepherd R.** Growth hormone treatment enhances nutrition and growth in children with cystic fibrosis receiving enteral nutrition. *J Pediatr*. 2005 Mar;146(3):324-8.(a)
- Hardin DS, Ferkol T, Ahn C, Dreimane D, Dyson M, Morse M, Prestidge C, Rice J, Seilheimer DK.** A retrospective study of growth hormone use in adolescents with cystic fibrosis. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005 May;62(5):560-6. (b)

- Hardin DS, Ahn C, Prestidge C, Seilheimer DK, Ellis KJ.** Growth hormone improves bone mineral content in children with cystic fibrosis. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2005 Jun;18(6):589-95. (c)
- Hardin DS, Rice J, Doyle ME, Pavia A.** Growth hormone improves protein catabolism and growth in prepubertal children with HIV infection. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2005 Sep;63(3):259-62. (d)
- Hardin DS, Adams-Huet B, Brown D, Chatfield B, Dyson M, Ferkol T, Howenstine M, Prestidge C, Royce F, Rice J, Seilheimer DK, Steelman J, Shepherds R.** Growth hormone treatment improves growth and clinical status in prepubertal children with cystic fibrosis: results of a multicenter randomized controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Dec;91(12):4925-9.
- Harmey D, Hessle L, Narisawa S, Johnson KA, Terkeltaub R, Millán JL.** Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by *akp2*, *enpp1*, and *ank*: an integrated model of the pathogenesis of mineralization disorders. *Am J Pathol.* 2004 Apr;164(4):1199-209.
- Harper MH.** Congenital steatorrhea due to pancreatic defect. *Arch Dis Child.* 1938 Mar;13(73):45-56.
- Haston CK, Li W, Li A, Lafleur M, Henderson JE.** Persistent osteopenia in adult cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008 Feb 1;177(3):309-15.
- Hauge EM, Qvesel D, Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F.** Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. *J Bone Miner Res.* 2001 Sep;16(9):1575-82.
- Haworth CS, Selby PL, Webb AK, Adams JE.** Osteoporosis in adults with cystic fibrosis. *J R Soc Med.* 1998;91 Suppl 34:14-8.
- Haworth CS, Selby PL, Webb AK, Adams JE, Freemont TJ.** Oral corticosteroids and bone pain after pamidronate in adults with cystic fibrosis. *Lancet.* 1999 May 29;353(9167):1886.
- Haworth CS, Webb AK, Egan JJ, Selby PL, Hasleton PS, Bishop PW, Freemont TJ.** Bone histomorphometry in adult patients with cystic fibrosis. *Chest.* 2000 Aug;118(2):434-9.
- Haworth CS, Webb AK, Elkin SL, Hodson ME, Compston JE, Selby PL.** Cystic fibrosis related low bone density. *Arch Dis Child.* 2000 Oct;83(4):369.
- Haworth CS.** Impact of cystic fibrosis on bone health. *Curr Opin Pulm Med.* 2010 Nov;16(6):616-22.
- Hayden MS, Ghosh S.** Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 2004 Sep 15;18(18):2195-224.
- Hazenberg JG, Freeley M, Foran E, Lee TC, Taylor D.** Microdamage: a cell transducing mechanism based on ruptured osteocyte processes. *J Biomech.* 2006;39(11):2096-103.
- Heeley AF, Bangert SK.** The neonatal detection of cystic fibrosis by measurement of immunoreactive trypsin in blood. *Ann Clin Biochem.* 1992 Jul;29 (Pt 4):361-76.
- Henderson RC, Madsen CD.** Bone mineral content and body composition in children and young adults with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 1999 Feb;27(2):80-4.
- Hillman LS, Cassidy JT, Popescu MF, Hewett JE, Kyger J, Robertson JD.** Percent true calcium absorption, mineral metabolism, and bone mineralization in children with cystic fibrosis: effect of supplementation with vitamin D and calcium. *Pediatr Pulmonol.* 2008 Aug;43(8):772-80.
- Ho LP, Samways JM, Porteous DJ, Dorin JR, Carothers A, Greening AP, Innes JA.** Correlation between nasal potential difference measurements, genotype and clinical condition in patients with cystic fibrosis. *Eur Respir J.* 1997 Sep;10(9):2018-22.
- Hofbauer LC, Kühne CA, Viereck V.** The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2004 Sep;4(3):268-75.
- Höfmann T, Bohmer O, Hüls G, Terbrack HG, Bittner P, Klingmüller V, Heerd E, Lindemann H.** Conventional and modified nasal potential-difference measurement in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Jun;155(6):1908-13.
- Hogan DL, Crombie DL, Isenberg JI, Svendsen P, Schaffalitzky de Muckadell OB, Ainsworth MA.** CFTR mediates cAMP- and Ca²⁺-activated duodenal epithelial HCO₃⁻ secretion. *Am J Physiol.* 1997 Apr;272(4 Pt 1):G872-8.
- Holmdahl R, Jansson L, Andersson M.** Female sex hormones suppress development of collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 1986 Dec;29(12):1501-9.

- Holsclaw DS, Shwachman H.** Increased incidence of inguinal hernia, hydrocele, and undescended testicle in males with cystic fibrosis. *Pediatrics*. 1971 Sep;48(3):442-5.
- Howard M, Frizzell RA, Bedwell DM.** Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations. *Nat Med*. 1996 Apr;2(4):467-9.
- Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan HL, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I, Wang L, Xia XZ, Elliott R, Chiu L, Black T, Scully S, Capparelli C, Morony S, Shimamoto G, Bass MB, Boyle WJ.** Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Mar 30;96(7):3540-5.
- Hunter GK, Goldberg HA.** Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Sep 15;90(18):8562-5.
- Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA.** Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J*. 1996 Jul 1;317 (Pt 1):59-64.
- Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE, Higgins CF.** Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature*. 1990 Jul 26;346(6282):362-5.
- Illek B, Zhang L, Lewis NC, Moss RB, Dong JY, Fischer H.** Defective function of the cystic fibrosis-causing missense mutation G551D is recovered by genistein. *Am J Physiol*. 1999 Oct;277(4 Pt 1):C833-9.
- Inoue K, Mikuni-Takagaki Y, Oikawa K, Itoh T, Inada M, Noguchi T, Park JS, Onodera T, Krane SM, Noda M, Itoharu S.** A crucial role for matrix metalloproteinase 2 in osteocytic canalicular formation and bone metabolism. *J Biol Chem*. 2006 Nov 3;281(44):33814-24.
- Ionescu AA, Nixon LS, Evans WD, Stone MD, Lewis-Jenkins V, Chatham K, Shale DJ.** Bone density, body composition, and inflammatory status in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Sep;162(3 Pt 1):789-94.
- Ishiguro H, Steward MC, Naruse S, Ko SB, Goto H, Case RM, Kondo T, Yamamoto A.** CFTR functions as a bicarbonate channel in pancreatic duct cells. *J Gen Physiol*. 2009 Mar;133(3):315-26.
- Jacob JR, Mansfield K, You JE, Tennant BC, Kim YH.** Natural iminosugar derivatives of 1-deoxynojirimycin inhibit glycosylation of hepatitis viral envelope proteins. *J Microbiol*. 2007 Oct;45(5):431-40.
- Janssens K, ten Dijke P, Janssens S, Van Hul W.** Transforming growth factor-beta1 to the bone. *Endocr Rev*. 2005 Oct;26(6):743-74.
- Javier RM, Jacquot J.** Bone disease in cystic fibrosis: what's new? *Joint Bone Spine*. 2011 Oct;78(5):445-50.
- Jenkins BA, Glenn LL.** Miglustat effects on the basal nasal potential differences in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2012 Jul 4.
- Jensen TJ, Loo MA, Pind S, Williams DB, Goldberg AL, Riordan JR.** Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell*. 1995 Oct 6;83(1):129-35.
- Jilka RL.** Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. *Bone*. 2007 Jun;40(6):1434-46.
- Johannesson M, Landgren BM, Csemiczky G, Hjelte L, Gottlieb C.** Female patients with cystic fibrosis suffer from reproductive endocrinological disorders despite good clinical status. *Hum Reprod*. 1998 Aug;13(8):2092-7.
- Joseph PM, O'Sullivan BP, Lapey A, Dorkin H, Oren J, Balfour R, Perricone MA, Rosenberg M, Wadsworth SC, Smith AE, St George JA, Meeker DP.** Aerosol and lobar administration of a recombinant adenovirus to individuals with cystic fibrosis. I. Methods, safety, and clinical implications. *Hum Gene Ther*. 2001 Jul 20;12(11):1369-82.
- Jüppner H, Abou-Samra AB, Freeman M, Kong XF, Schipani E, Richards J, Kolakowski LF Jr, Hock J, Potts JT Jr, Kronenberg HM, Segre GV.** A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science*. 1991 Nov 15;254(5034):1024-6.
- Kamioka H, Honjo T, Takano-Yamamoto T.** A three-dimensional distribution of osteocyte processes revealed by the combination of confocal laser scanning microscopy and differential interference contrast microscopy. *Bone*. 2001 Feb;28(2):145-9.
- Kaneki H, Guo R, Chen D, Yao Z, Schwarz EM, Zhang YE, Boyce BF, Xing L.** Tumor necrosis factor promotes Runx2 degradation through up-regulation of Smurf1 and Smurf2 in osteoblasts. *J Biol Chem*. 2006 Feb 17;281(7):4326-33.

- Karaplis AC.** Embryonic development bone and the molecular regulation of intramembranous and endochondrale bone formation. *Principes of bone biology. 2nde ed. Dir. Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. San Diego: Academic Press;2002:33-58.*
- Kasukawa Y, Miyakoshi N, Mohan S.** The anabolic effects of GH/IGF system on bone. *Curr Pharm Des. 2004;10(21):2577-92.*
- Kassem M, Abdallah BM, Saeed H.** Osteoblastic cells: differentiation and trans-differentiation. *Arch Biochem Biophys. 2008 May 15;473(2):183-7.*
- Kearns Ann E., Khosla Sundeep, Kostenuik Paul J.** Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand and Osteoprotegerin Regulation of Bone Remodeling in Health and Disease. *Endocr Rev. 2008 April; 29(2): 155–192. Published online 2007 December 5. doi: 10.1210/er.2007-0014*
- Keiser NW, Engelhardt JF.** New animal models of cystic fibrosis: what are they teaching us? *Curr Opin Pulm Med. 2011 Nov;17(6):478-83.*
- Kennedy MJ.** Current status of gene therapy for cystic fibrosis pulmonary disease. *Am J Respir Med. 2002;1(5):349-60.*
- Kerem BS, Buchanan JA, Durie P, Corey ML, Levison H, Rommens JM, Buchwald M, Tsui LC.** DNA marker haplotype association with pancreatic sufficiency in cystic fibrosis. *Am J Hum Genet. 1989 Jun;44(6):827-34.*
- Kerem E.** Mutation specific therapy in CF. *Paediatr Respir Rev. 2006;7 Suppl 1:S166-9.*
- Khosla S, Riggs BL, Atkinson EJ, Oberg AL, McDaniel LJ, Holets M, Peterson JM, Melton LJ 3rd.** Effects of sex and age on bone microstructure at the ultradistal radius: a population-based noninvasive in vivo assessment. *J Bone Miner Res. 2006 Jan;21(1):124-31.*
- Khosla S.** Estrogen and bone: insights from estrogen-resistant, aromatase-deficient, and normal men. *Bone. 2008 Sep;43(3):414-7.*
- King SJ, Topliss DJ, Kotsimbos T, Nyulasi IB, Bailey M, Ebeling PR, Wilson JW.** Reduced bone density in cystic fibrosis: DeltaF508 mutation is an independent risk factor. *Eur Respir J. 2005 Jan;25(1):54-61.*
- Knowles MR, Carson JL, Collier AM, Gatzky JT, Boucher RC.** Measurements of nasal transepithelial electric potential differences in normal human subjects in vivo. *Am Rev Respir Dis. 1981 Oct;124(4):484-90.*
- Knowles M, Gatzky J, Boucher R.** Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. *N Engl J Med. 1981 Dec 17;305(25):1489-95.*
- Knowles MR, Paradiso AM, Boucher RC.** In vivo nasal potential difference: techniques and protocols for assessing efficacy of gene transfer in cystic fibrosis. *Hum Gene Ther. 1995 Apr;6(4):445-55.*
- Kogan I, Ramjeesingh M, Li C, Kidd JF, Wang Y, Leslie EM, Cole SP, Bear CE.** CFTR directly mediates nucleotide-regulated glutathione flux. *EMBO J. 2003 May 1;22(9):1981-9.*
- Komori T.** Regulation of bone development and maintenance by Runx2. *Front Biosci,2008, 13:898-903.*
- Kone Paut I, Gennari JM, Retornaz K, Jouve JL, Bollini G.** Biphosphonates in children: present and future. *Arch Pediatr. 2002 Aug;9(8):836-42.*
- Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA.** Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest. 2006 May;116(5):1202-9.*
- Krouse ME, Talbott JF, Lee MM, Joo NS, Wine JJ.** Acid and base secretion in the Calu-3 model of human serous cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2004 Dec;287(6):L1274-83.*
- Krum SA, Chang J, Miranda-Carboni G, Wang CY.** Novel functions for NF κ B : inhibition of bone formation. *Nat Rev Rheumatol. 2010 Oct;6(10):607-11.*
- Krysa J, Steger A.** Pancreas and cystic fibrosis: the implications of increased survival in cystic fibrosis. *Pancreatol. 2007;7(5-6):447-50.*
- Labbé A, Bellon G, Héraud MC, Arbre P, Goddon G, Alton E.** [Determination of nasal transepithelial potential difference (DDPTE) in cystic fibrosis. Analysis of a simplified measurement technique]. *Arch Fr Pediatr. 1991 Nov;48(9):617-20.*
- Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ.** Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell. 1998 Apr 17;93(2):165-76.*

- Lakkakorpi PT, Väänänen HK.** Cytoskeletal changes in osteoclasts during the resorption cycle. *Microsc Res Tech.* 1996 Feb 1;33(2):171-81.
- Lalou C, Silve C, Rosato R, Segovia B, Binoux M.** Interactions between insulin-like growth factor-I (IGF-I) and the system of plasminogen activators and their inhibitors in the control of IGF-binding protein-3 production and proteolysis in human osteosarcoma cells. *Endocrinology.* 1994 Dec;135(6):2318-26.
- Landis WJ, Hodgens KJ, Arena J, Song MJ, McEwen BF.** Structural relations between collagen and mineral in bone as determined by high voltage electron microscopic tomography. *Microsc Res Tech.* 1996 Feb 1;33(2):192-202.
- Landon C, Rosenfeld RG.** Short stature and pubertal delay in male adolescents with cystic fibrosis. Androgen treatment. *Am J Dis Child.* 1984 Apr;138(4):388-91.
- Larson JE, Cohen JC.** Improvement of pulmonary hypoplasia associated with congenital diaphragmatic hernia by in utero CFTR gene therapy. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006 Jul;291(1):L4-10.
- Latzin P, Griese M, Hermanns V, Kammer B.** Sternal fracture with fatal outcome in cystic fibrosis. *Thorax.* 2005 Jul;60(7):616.
- Le Henaff C, Gimenez A, Haÿ E, Marty C, Marie P, Jacquot J.** The F508del mutation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene impacts bone formation. *Am J Pathol.* 2012 May;180(5):2068-75.
- Le Heron L, Guillaume C, Velard F, Braux J, Touqui L, Moriceau S, Sermet-Gaudelus I, Laurent-Maquin D, Jacquot J.** Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) regulates the production of osteoprotegerin (OPG) and prostaglandin (PG) E2 in human bone. *J Cyst Fibros.* 2010 Jan;9(1):69-72.
- Leblais V, Demolombe S, Vallette G, Langin D, Baró I, Escande D, Gauthier C.** beta3-adrenoceptor control the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator through a cAMP/protein kinase A-independent pathway. *J Biol Chem.* 1999 Mar 5;274(10):6107-13.
- LeGrys VA.** Sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis: practical considerations. *J Pediatr.* 1996 Dec;129(6):892-7.
- Leonard A, Lebecque P, Dingemans J, Leal T.** Miglustat effects on the basal nasal potential differences in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2012 Jun 22.
- Li J, Sarosi I, Cattle RC, Pretorius J, Asuncion F, Grisanti M, Morony S, Adamu S, Geng Z, Qiu W, Kostenuik P, Lacey DL, Simonet WS, Bolon B, Qian X, Shalhoub V, Ominsky MS, Zhu Ke H, Li X, Richards WG.** Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia. *Bone.* 2006 Oct;39(4):754-66.
- Li X, Ominsky MS, Niu QT, Sun N, Daugherty B, D'Agostin D, Kurahara C, Gao Y, Cao J, Gong J, Asuncion F, Barrero M, Warmington K, Dwyer D, Stolina M, Morony S, Sarosi I, Kostenuik PJ, Lacey DL, Simonet WS, Ke HZ, Paszty C.** Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength. *J Bone Miner Res.* 2008 Jun;23(6):860-9
- Li X, Ominsky MS, Warmington KS, Morony S, Gong J, Cao J, Gao Y, Shalhoub V, Tipton B, Haldankar R, Chen Q, Winters A, Boone T, Geng Z, Niu QT, Ke HZ, Kostenuik PJ, Simonet WS, Lacey DL, Paszty C.** Sclerostin antibody treatment increases bone formation, bone mass, and bone strength in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 2009 Apr;24(4):578-88.
- Li Y, Li A, Strait K, Zhang H, Nanes MS, Weitzmann MN.** Endogenous TNFalpha lowers maximum peak bone mass and inhibits osteoblastic Smad activation through NF-kappaB. *J Bone Miner Res.* 2007 May;22(5):646-55
- Linde L, Boelz S, Nissim-Rafinia M, Oren YS, Wilschanski M, Yaacov Y, Virgilis D, Neu-Yilik G, Kulozik AE, Kerem E, Kerem B.** Nonsense-mediated mRNA decay affects nonsense transcript levels and governs response of cystic fibrosis patients to gentamicin. *J Clin Invest.* 2007 Mar;117(3):683-92.
- Linsdell P, Hanrahan JW.** Adenosine triphosphate-dependent asymmetry of anion permeation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *J Gen Physiol.* 1998 Apr;111(4):601-14.
- Loussouarn G, Demolombe S, Mohammad-Panah R, Escande D, Baró I.** Expression of CFTR controls cAMP-dependent activation of epithelial K⁺ currents. *Am J Physiol.* 1996 Nov;271(5 Pt 1):C1565-73.
- Lu C, Jiang C, Pribanic S, Rotin D.** CFTR stabilizes ENaC at the plasma membrane. *J Cyst Fibros.* 2007 Nov 30;6(6):419-22.
- Lubamba B, Lebacqz J, Lebecque P, Vanbever R, Leonard A, Wallemaq P, Leal T.** Airway delivery of low-dose miglustat normalizes nasal potential difference in F508del cystic fibrosis mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009 Jun 1;179(11):1022-8.

- Lubamba B, Dhooghe B, Noel S, Leal T.** Cystic fibrosis: Insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy. *Clin Biochem.* 2012 Oct;45(15):1132-44.
- Lukacs GL, Segal G, Kartner N, Grinstein S, Zhang F.** Constitutive internalization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator occurs via clathrin-dependent endocytosis and is regulated by protein phosphorylation. *Biochem J.* 1997 Dec 1;328 (Pt 2):353-61.
- Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB.** Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Apr;15(2):194-222.
- Lyczak JB, Pier GB.** Salmonella enterica serovar typhi modulates cell surface expression of its receptor, the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, on the intestinal epithelium. *Infect Immun.* 2002 Nov;70(11):6416-23.
- Machwate M, Zerath E, Holy X, Pastoureau P, Marie PJ.** Insulin-like growth factor-I increases trabecular bone formation and osteoblastic cell proliferation in unloaded rats. *Endocrinology.* 1994 Mar;134(3):1031-8.
- Maldonado M, Martínez A, Alobid I, Mullol J.** The antrochoanal polyp. *Rhinology.* 2004 Dec;42(4):178-82.
- Mall M, Bleich M, Greger R, Schreiber R, Kunzelmann K.** The amiloride-inhibitable Na⁺ conductance is reduced by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal but not in cystic fibrosis airways. *J Clin Invest.* 1998 Jul 1;102(1):15-21.
- Mall M, Grubb BR, Harkema JR, O'Neal WK, Boucher RC.** Increased airway epithelial Na⁺ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nat Med.* 2004 May;10(5):487-93.
- Mall M, Kunzelmann K.** Correction of the CF defect by curcumin: hopes and disappointments. *Bioessays.* 2005 Jan;27(1):9-13.
- Manolagas SC, Jilka RL.** Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med.* 1995 Feb 2;332(5):305-11.
- Manolagas SC.** Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2000 Apr;21(2):115-37.
- Marchand M, Jarreau C, Chauffert M, Garcia I, Asselin D, Thouvenot JP, Genest AF.** [Sweat test]. *Ann Biol Clin (Paris).* 1998 Mar-Apr;56(2):215-21.
- Marie PJ.** The molecular genetics of bone formation: implications for therapeutic interventions in bone disorders. *Am J Pharmacogenomics.* 2001;1(3):175-87.
- Marie PJ.** Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation. *Gene.* 2003 Oct 16;316:23-32.
- Marie PJ.** Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch Biochem Biophys.* 2008, 473:98-105.
- Marie PJ.** Bone cell-matrix protein interactions. *Osteoporos Int.* 2009 Jun;20(6):1037-42.
- Marie PJ.** The calcium-sensing receptor in bone cells: a potential therapeutic target in osteoporosis. *Bone.* 2010 Mar;46(3):571-6.
- Marie PJ, Kassem M.** Extrinsic mechanisms involved in age-related defective bone formation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Mar;96(3):600-9.
- Marie PJ.** Bone remodeling : a social network of cells *medicographia* 2012 vol35, n°2
- Marotti G, Cane V, Palazzini S, Palumbo C.** Structure-fonction relationships in the osteocyte. *Ital J Miner electrolyte Metab* 1990;4:93-106.
- Martin TJ, Seeman E.** Bone remodelling: its local regulation and the emergence of bone fragility. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2008 Oct;22(5):701-22.
- Masi L, Brandi ML, Robey PG, Crescioli C, Calvo JC, Bernabei P, Kerr JM, Yanagishita M.** Biosynthesis of bone sialoprotein by a human osteoclast-like cell line (FLG 29.1). *J Bone Miner Res.* 1995 Feb;10(2):187-96.
- McHugh KP, Hodivala-Dilke K, Zheng MH, Namba N, Lam J, Novack D, Feng X, Ross FP, Hynes RO, Teitelbaum SL.** Mice lacking beta3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. *J Clin Invest.* 2000 Feb;105(4):433-40.
- Meyerholz DK, Stoltz DA, Pezzulo AA, Welsh MJ.** Pathology of gastrointestinal organs in a porcine model of cystic fibrosis. *Am J Pathol.* 2010 Mar;176(3):1377-89.

- Michoud MC, Robert R, Hassan M, Moynihan B, Haston C, Govindaraju V, Ferraro P, Hanrahan JW, Martin JG.** Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance channel in human airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009 Feb;40(2):217-22.
- Middleton PG, Geddes DM, Alton EW.** Protocols for in vivo measurement of the ion transport defects in cystic fibrosis nasal epithelium. *Eur Respir J.* 1994 Nov;7(11):2050-6.
- Mishra A, Greaves R, Massie J.** The relevance of sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis in the genomic era. *Clin Biochem Rev.* 2005 Nov;26(4):135-53.
- Moran O, Zegarra-Moran O.** A quantitative description of the activation and inhibition of CFTR by potentiators: Genistein. *FEBS Lett.* 2005 Jul 18;579(18):3979-83.
- Morral N, Nunes V, Casals T, Chillón M, Giménez J, Bertranpetit J, Estivill X.** Microsatellite haplotypes for cystic fibrosis: mutation frameworks and evolutionary tracers. *Hum Mol Genet.* 1993 Jul;2(7):1015-22.
- Morral N, Bertranpetit J, Estivill X, Nunes V, Casals T, Giménez J, Reis A, Varon-Mateeva R, Macek M Jr, Kalaydjieva L, et al.** The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta F508) in European populations. *Nat Genet.* 1994 Jun;7(2):169-75.
- Morvan F, Boulukos K, Clément-Lacroix P, Roman Roman S, Suc-Royer I, Vayssière B, Ammann P, Martin P, Pinho S, Pognonec P, Mollat P, Niehrs C, Baron R, Rawadi G.** Deletion of a single allele of the Dkk1 gene leads to an increase in bone formation and bone mass. *J Bone Miner Res.* 2006 Jun;21(6):934-45.
- Moss RB, Rodman D, Spencer LT, Aitken ML, Zeitlin PL, Waltz D, Milla C, Brody AS, Clancy JP, Ramsey B, Hamblett N, Heald AE.** Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Chest.* 2004 Feb;125(2):509-21.
- Moss RB, Milla C, Colombo J, Accurso F, Zeitlin PL, Clancy JP, Spencer LT, Pilewski J, Waltz DA, Dorkin HL, Ferkol T, Pian M, Ramsey B, Carter BJ, Martin DB, Heald AE.** Repeated aerosolized AAV-CFTR for treatment of cystic fibrosis: a randomized placebo-controlled phase 2B trial. *Hum Gene Ther.* 2007 Aug;18(8):726-32.
- Mueller K, Cortesi R, Modrowski D, Marie PJ.** Stimulation of trabecular bone formation by insulin-like growth factor I in adult ovariectomized rats. *Am J Physiol.* 1994 Jul;267(1 Pt 1):E1-6.
- Murray GI.** Matrix metalloproteinases: a multifunctional group of molecules. *J Pathol.* 2001 Sep;195(2):135-7.
- Murshed M, Harmeey D, Millán JL, McKee MD, Karsenty G.** Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes Dev.* 2005 May 1;19(9):1093-104.
- Neudorfer O, Kolodny EH.** Late-onset Tay-Sachs disease. *Isr Med Assoc J.* 2004 Feb;6(2):107-11.
- Newton G, Weremowicz S, Morton CC, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Lawler J.** The thrombospondin-4 gene. *Mamm Genome.* 1999 Oct;10(10):1010-6.
- Nicolaidou P, Stavriniadis I, Loukou I, Papadopoulou A, Georgouli H, Douros K, Priftis KN, Gourgiotis D, Matsinos YG, Doudounakis S.** The effect of vitamin K supplementation on biochemical markers of bone formation in children and adolescents with cystic fibrosis. *Eur J Pediatr.* 2006 Aug;165(8):540-5.
- Nielsen BB, Kastrup JS, Rasmussen H, Holtet TL, Graversen JH, Etzerodt M, Thøgersen HC, Larsen IK.** Crystal structure of tetranectin, a trimeric plasminogen-binding protein with an alpha-helical coiled coil. *FEBS Lett.* 1997 Jul 28;412(2):388-96.
- Nilius B, Droogmans G.** Amazing chloride channels: an overview. *Acta Physiol Scand.* 2003 Feb;177(2):119-47.
- Noble B.** Microdamage and apoptosis. *Eur J Morphol.* 2005 Feb-Apr;42(1-2):91-8.
- Noble BS.** The osteocyte lineage. *Arch Biochem Biophys.* 2008 May 15;473(2):106-11.
- Noël S, Wilke M, Bot AG, De Jonge HR, Becq F.** Parallel improvement of sodium and chloride transport defects by miglustat (n-butyldeoxyynojrimicin) in cystic fibrosis epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008 Jun;325(3):1016-23.
- Norez C, Noël S, Wilke M, Bijvelds M, Jorna H, Melin P, DeJonge H, Becq F.** Rescue of functional delF508-CFTR channels in cystic fibrosis epithelial cells by the alpha-glucosidase inhibitor miglustat. *FEBS Lett.* 2006 Apr 3;580(8):2081-6.
- Norez C, Antigny F, Noël S, Vandebrouck C, Becq F.** A cystic fibrosis respiratory epithelial cell chronically treated by miglustat acquires a non-cystic fibrosis-like phenotype. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009 Aug;41(2):217-25.

- Novack DV.** Role of NF- κ B in the skeleton. *Cell Res.* 2011 Jan;21(1):169-82.
- Nyman JS, Reyes M, Wang X.** Effect of ultrastructural changes on the toughness of bone. *Micron* 2005;36:566-582.
- O'Connor GT, Quinton HB, Kahn R, Robichaud P, Maddock J, Lever T, Detzer M, Brooks JG; Northern New England Cystic Fibrosis Consortium.** Case-mix adjustment for evaluation of mortality in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2002 Feb;33(2):99-105.
- O'Sullivan BP, Freedman SD.** Cystic fibrosis. *Lancet.* 2009 May 30;373(9678):1891-904.
- Ominsky MS, Li X, Asuncion FJ, Barrero M, Warmington KS, Dwyer D, Stolina M, Geng Z, Grisanti M, Tan HL, Corbin T, McCabe J, Simonet WS, Ke HZ, Kostenuik PJ.** RANKL inhibition with osteoprotegerin increases bone strength by improving cortical and trabecular bone architecture in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res.* 2008 May;23(5):672-82.
- Ominsky MS, Vlasseros F, Jolette J, Smith SY, Stouch B, Doellgast G, Gong J, Gao Y, Cao J, Graham K, Tipton B, Cai J, Deshpande R, Zhou L, Hale MD, Lightwood DJ, Henry AJ, Popplewell AG, Moore AR, Robinson MK, Lacey DL, Simonet WS, Paszty C.** Two doses of sclerostin antibody in cynomolgus monkeys increases bone formation, bone mineral density, and bone strength. *J Bone Miner Res.* 2010 May;25(5):948-59.
- Ostedgaard LS, Meyerholz DK, Chen JH, Pezzulo AA, Karp PH, Rokhlina T, Ernst SE, Hanfland RA, Reznikov LR, Ludwig PS, Rogan MP, Davis GJ, Dohrn CL, Wohlford-Lenane C, Taft PJ, Rector MV, Hornick E, Nassar BS, Samuel M, Zhang Y, Richter SS, Uc A, Shilyansky J, Prather RS, McCray PB Jr, Zabner J, Welsh MJ, Stoltz DA.** The Δ F508 mutation causes CFTR misprocessing and cystic fibrosis-like disease in pigs. *Sci Transl Med.* 2011 Mar 16;3(74):74ra24.
- Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS.** Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol.* 1990 Jun;143(3):420-30.
- Paccou J, Zeboulon N, Combescure C, Gossec L, Cortet B.** The prevalence of osteoporosis, osteopenia, and fractures among adults with cystic fibrosis: a systematic literature review with meta-analysis. *Calcif Tissue Int.* 2010 Jan;86(1):1-7.
- Palumbo C.** A three-dimensional ultrastructural study of osteoid-osteocytes in the tibia of chick embryos. *Cell Tissue Res.* 1986;246(1):125-31.
- Pande I, Hosking DJ.** Oral antiresorptive therapy. *Curr Rheumatol Rep.* 2005 Mar;7(1):71-7.
- Papaioannou A, Kennedy CC, Freitag A, O'Neill J, Pui M, Ioannidis G, Webber C, Pathak A, Hansen S, Hennessey R, Adachi JD.** Longitudinal analysis of vertebral fracture and BMD in a Canadian cohort of adult cystic fibrosis patients. *BMC Musculoskelet Disord.* 2008 Sep 19;9:125
- Paradis J, Wilke M, Haston CK.** Osteopenia in Cfr-deltaF508 mice. *J Cyst Fibros.* 2010 Jul;9(4):239-45.
- Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR.** Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 1987 Dec;2(6):595-610.
- Parfitt AM.** Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem.* 1994 Jul;55(3):273-86.
- Parfitt AM, Mundy GR, Roodman GD, Hughes DE, Boyce BF.** A new model for the regulation of bone resorption, with particular reference to the effects of bisphosphonates. *J Bone Miner Res.* 1996 Feb;11(2):150-9.
- Park M, Ko SB, Choi JY, Muallem G, Thomas PJ, Pushkin A, Lee MS, Kim JY, Lee MG, Muallem S, Kurtz I.** The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator interacts with and regulates the activity of the HCO₃⁻ salvage transporter human Na⁺-HCO₃⁻ cotransport isoform 3. *J Biol Chem.* 2002 Dec 27;277(52):50503-9.
- Pashuck TD, Franz SE, Altman MK, Wasserfall CH, Atkinson MA, Wronski TJ, Flotte TR, Stalvey MS.** Murine model for cystic fibrosis bone disease demonstrates osteopenia and sex-related differences in bone formation. *Pediatr Res.* 2009 Mar;65(3):311-6.
- Pastores GM, Elstein D, Hrebíček M, Zimran A.** Effect of miglustat on bone disease in adults with type 1 Gaucher disease: a pooled analysis of three multinational, open-label studies. *Clin Ther.* 2007 Aug;29(8):1645-54.
- Perez A, Issler AC, Cotton CU, Kelley TJ, Verkman AS, Davis PB.** CFTR inhibition mimics the cystic fibrosis inflammatory profile. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007 Feb;292(2):L383-95.

- Pezzulo AA, Tang XX, Hoegger MJ, Alaiwa MH, Ramachandran S, Moninger TO, Karp PH, Wohlford-Lenane CL, Haagsman HP, van Eijk M, Bánfi B, Horswill AR, Stoltz DA, McCray PB Jr, Welsh MJ, Zabner J.** Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature*. 2012 Jul 4;487(7405):109-13.
- Phillipson G.** Cystic fibrosis and reproduction. *Reprod Fertil Dev*. 1998;10(1):113-9.
- Pier GB, Grout M, Zaidi T, Meluleni G, Mueschenborn SS, Banting G, Ratcliff R, Evans MJ, Colledge WH.** Salmonella typhi uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature*. 1998 May 7;393(6680):79-82.
- Pietrement C, Da Silva N, Silberstein C, James M, Marsolais M, Van Hoek A, Brown D, Pastor-Soler N, Ameen N, Laprade R, Ramesh V, Breton S.** Role of NHERF1, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, and cAMP in the regulation of aquaporin 9. *J Biol Chem*. 2008 Feb 1;283(5):2986-96.
- Platt FM, Neises GR, Karlsson GB, Dwek RA, Butters TD.** N-butyldeoxygalactonojirimycin inhibits glycolipid biosynthesis but does not affect N-linked oligosaccharide processing. *J Biol Chem*. 1994 Oct 28;269(43):27108-14. (a)
- Platt FM, Neises GR, Dwek RA, Butters TD.** N-butyldeoxynojirimycin is a novel inhibitor of glycolipid biosynthesis. *J Biol Chem*. 1994 Mar 18;269(11):8362-5. (b)
- Proff P, Römer P.** The molecular mechanism behind bone remodelling: a review. *Clin Oral Investig*. 2009 Dec;13(4):355-62.
- Quinton PM.** Suggestion of an abnormal anion exchange mechanism in sweat glands of cystic fibrosis patients. *Pediatr Res*. 1982 Jul;16(7):533-7.
- Quinton PM.** Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature*. 1983 Feb 3;301(5899):421-2.
- Quinton PM.** Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective. *Physiol Rev*. 1999 Jan;79(1 Suppl):S3-S22.
- Raggatt LJ, Partridge NC.** Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem*. 2010 Aug 13;285(33):25103-8.
- Ramsey B, Richardson MA.** Impact of sinusitis in cystic fibrosis. *J Allergy Clin Immunol*. 1992 Sep;90(3 Pt 2):547-52.
- Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, Tullis E, Bell SC, Dřevínek P, Griese M, McKone EF, Wainwright CE, Konstan MW, Moss R, Ratjen F, Sermet-Gaudelus I, Rowe SM, Dong Q, Rodriguez S, Yen K, Ordoñez C, Elborn JS; VX08-770-102 Study Group.** A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med*. 2011 Nov 3;365(18):1663-72.
- Ravindran S, Narayanan K, Eapen AS, Hao J, Ramachandran A, Blond S, George A.** Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP-78 mediates endocytosis of dentin matrix protein 1. *J Biol Chem*. 2008 Oct 31;283(44):29658-70.
- Register TC, Wuthier RE.** Effect of vanadate, a potent alkaline phosphatase inhibitor, on ⁴⁵Ca and ³²Pi uptake by matrix vesicle-enriched fractions from chicken epiphyseal cartilage. *J Biol Chem*. 1984 Mar 25;259(6):3511-8.
- Reich DE, Lander ES.** On the allelic spectrum of human disease. *Trends Genet*. 2001 Sep;17(9):502-10.
- Rho JY, Kuhn-Spearing L, Zioupos P.** Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med Eng Phys*. 1998 Mar;20(2):92-102.
- Riggs BL, Parfitt AM.** Drugs used to treat osteoporosis: the critical need for a uniform nomenclature based on their action on bone remodeling. *J Bone Miner Res*. 2005 Feb;20(2):177-84.
- Ringuier B, Leboucher B, Leblanc M, Troussier F, Duveau E, Audran M, Giniès JL.** Effect of oral bisphosphonates in patients with cystic fibrosis and low bone mineral density. *Arch Pediatr*. 2004 Dec;11(12):1445-9.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui L.** Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 1989 Sep 8;245(4922):1066-73. Erratum in: *Science* 1989 Sep 29;245(4925):1437.
- Robert JJ.** « Diabète de la mucoviscidose », *Médecine thérapeutique / Pédiatrie*, vol. 8, no 3, mai-juin 2005, p. 217-24
- Robert R, Carlile GW, Pavel C, Liu N, Anjos SM, Liao J, Luo Y, Zhang D, Thomas DY, Hanrahan JW.** Structural analog of sildenafil identified as a novel corrector of the F508del-CFTR trafficking defect. *Mol Pharmacol*. 2008 Feb;73(2):478-89.
- Robey PG.** Bone matrix proteoglycans and glycoproteins. *Principles of bone biology*. Dir. Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. San Diego: Academic Press; 2002:225-237.

- Robling AG, Niziolek PJ, Baldrige LA, Condon KW, Allen MR, Alam I, Mantila SM, Gluhak-Heinrich J, Bellido TM, Harris SE, Turner CH.** Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J Biol Chem.* 2008 Feb 29;283(9):5866-75.
- Rochholz EL.** « The child will soon die whose brows tastes salty when kissed. » Almanac of Children's Songs and Games from Switzerland. *Publié en 1857 par J. J. Weber. Titre original : Alemannisches Kinderlied und Kinderspiel aus der SchweizGesammelt (Leipzig 1857).*
- Rodgers HC, Knox AJ.** Pharmacological treatment of the biochemical defect in cystic fibrosis airways. *Eur Respir J.* 2001 Jun;17(6):1314-21.
- Rogan MP, Reznikov LR, Pezzulo AA, Gansemer ND, Samuel M, Prather RS, Zabner J, Fredericks DC, McCray PB Jr, Welsh MJ, Stoltz DA.** Pigs and humans with cystic fibrosis have reduced insulin-like growth factor 1 (IGF1) levels at birth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Nov 23;107(47):20571-5.
- Rogers CS, Hao Y, Rokhlina T, Samuel M, Stoltz DA, Li Y, Petroff E, Vermeer DW, Kabel AC, Yan Z, Spate L, Wax D, Murphy CN, Rieke A, Whitworth K, Linville ML, Korte SW, Engelhardt JF, Welsh MJ, Prather RS.** Production of CFTR-null and CFTR-DeltaF508 heterozygous pigs by adeno-associated virus-mediated gene targeting and somatic cell nuclear transfer. *J Clin Invest.* 2008 Apr;118(4):1571-7. (a)
- Rogers CS, Abraham WM, Brogden KA, Engelhardt JF, Fisher JT, McCray PB Jr, McLennan G, Meyerholz DK, Namati E, Ostedgaard LS, Prather RS, Sabater JR, Stoltz DA, Zabner J, Welsh MJ.** The porcine lung as a potential model for cystic fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008 Aug;295(2):L240-63. (b)
- Rogers CS, Stoltz DA, Meyerholz DK, Ostedgaard LS, Rokhlina T, Taft PJ, Rogan MP, Pezzulo AA, Karp PH, Itani OA, Kabel AC, Wohlford-Lenane CL, Davis GJ, Hanfland RA, Smith TL, Samuel M, Wax D, Murphy CN, Rieke A, Whitworth K, Uc A, Starner TD, Brogden KA, Shilyansky J, McCray PB Jr, Zabner J, Prather RS, Welsh MJ.** Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science.* 2008 Sep 26;321(5897):1837-41. (c)
- Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, et al.** Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science.* 1989 Sep 8;245(4922):1059-65.
- Rosen CJ, Bilezikian JP.** Clinical review 123: Anabolic therapy for osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Mar;86(3):957-64.
- Rosenberg LA, Schluchter MD, Parlow AF, Drumm ML.** Mouse as a model of growth retardation in cystic fibrosis. *Pediatr Res.* 2006 Feb;59(2):191-5.
- Rossini M, Del Marco A, Dal Santo F, Gatti D, Braggion C, James G, Adami S.** Prevalence and correlates of vertebral fractures in adults with cystic fibrosis. *Bone.* 2004 Sep;35(3):771-6.
- Roussey M,** « La mucoviscidose (cours en ligne) [archive] » sur <http://www.med.univ-rennes1.fr> [archive], 18 février 2000
- Rovner AJ, Zemel BS, Leonard MB, Schall JI, Stallings VA.** Mild to moderate cystic fibrosis is not associated with increased fracture risk in children and adolescents. *J Pediatr.* 2005 Sep;147(3):327-31.
- Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ.** Cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 2005 May 12;352(19):1992-2001.
- Rowntree RK, Harris A.** The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Ann Hum Genet.* 2003 Sep;67(Pt 5):471-85.
- Rubenstein RC, Egan ME, Zeitlin PL.** In vitro pharmacologic restoration of CFTR-mediated chloride transport with sodium 4-phenylbutyrate in cystic fibrosis epithelial cells containing delta F508-CFTR. *J Clin Invest.* 1997 Nov 15;100(10):2457-65.
- Saftig P, Hunziker E, Wehmeyer O, Jones S, Boyde A, Rommerskirch W, Moritz JD, Schu P, von Figura K.** Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Nov 10;95(23):13453-8.
- Schreiber R, Nitschke R, Greger R, Kunzelmann K.** The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates aquaporin 3 in airway epithelial cells. *J Biol Chem.* 1999 Apr 23;274(17):11811-6 (a)
- Schreiber R, Hopf A, Mall M, Greger R, Kunzelmann K.** The first-nucleotide binding domain of the cystic-fibrosis transmembrane conductance regulator is important for inhibition of the epithelial Na⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Apr 27;96(9):5310-5. (b)

- Schüler D, Sermet-Gaudelus I, Wilschanski M, Ballmann M, Dechaux M, Edelman A, Hug M, Leal T, Lebacqz J, Lebecque P, Lenoir G, Stanke F, Wallemacq P, Tümmler B, Knowles MR.** Basic protocol for transepithelial nasal potential difference measurements. *J Cyst Fibros.* 2004 Aug;3 Suppl 2:151-5.
- Schulze KJ, O'Brien KO, Germain-Lee EL, Booth SL, Leonard A, Rosenstein BJ.** Calcium kinetics are altered in clinically stable girls with cystic fibrosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jul;89(7):3385-91.
- Schwiebert EM, Morales MM, Devidas S, Egan ME, Guggino WB.** Chloride channel and chloride conductance regulator domains of CFTR, the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Mar 3;95(5):2674-9. (a)
- Schwiebert EM, Benos DJ, Egan ME, Stutts MJ, Guggino WB.** CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol Rev.* 1999 Jan;79(1 Suppl):S145-66.
- Seeman E.** Pathogenesis of bone fragility in women and men. *Lancet.* 2002 May 25;359(9320):1841-50.
- Seeman E.** Periosteal bone formation--a neglected determinant of bone strength. *N Engl J Med.* 2003 Jul 24;349(4):320-3.
- Semënov MV, Zhang X, He X.** DKK1 antagonizes Wnt signaling without promotion of LRP6 internalization and degradation. *J Biol Chem.* 2008 Aug 1;283(31):21427-32.
- Sermet-Gaudelus I, Renouil M, Fajac A, Bidou L, Parbaille B, Pierrot S, Davy N, Bismuth E, Reinert P, Lenoir G, Lesure JF, Rousset JP, Edelman A.** In vitro prediction of stop-codon suppression by intravenous gentamicin in patients with cystic fibrosis: a pilot study. *BMC Med.* 2007 Mar 29;5:5.
- Sermet-Gaudelus I, Souberbielle JC, Ruiz JC, Vrielynck S, Heuillon B, Azhar I, Cazenave A, Lawson-Body E, Chedeveigne F, Lenoir G.** Low bone mineral density in young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 May 1;175(9):951-7.
- Sermet-Gaudelus I, Castanet M, Retsch-Bogart G, Aris RM.** Update on cystic fibrosis-related bone disease: a special focus on children. *Paediatr Respir Rev.* 2009 Sep;10(3):134-42.
- Sermet-Gaudelus I, Boeck KD, Casimir GJ, Vermeulen F, Leal T, Mogenet A, Roussel D, Fritsch J, Hanssens L, Hirawat S, Miller NL, Constantine S, Reha A, Ajayi T, Elfring GL, Miller LL.** Ataluren (PTC124) induces cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein expression and activity in children with nonsense mutation cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 Nov 15;182(10):1262-72.
- Sermet-Gaudelus I, Bianchi ML, Garabédian M, Aris RM, Morton A, Hardin DS, Elkin SL, Compston JE, Conway SP, Castanet M, Wolfe S, Haworth CS.** European cystic fibrosis bone mineralisation guidelines. *J Cyst Fibros.* 2011 Jun;10 Suppl 2:S16-23.
- Serre JL, Simon-Bouy B, Mornet E, Jaume-Roig B, Balassopoulou A, Schwartz M, Taillandier A, Boué J, Boué A.** Studies of RFLP closely linked to the cystic fibrosis locus throughout Europe lead to new considerations in populations genetics. *Hum Genet.* 1990 Apr;84(5):449-54.
- Shane E, Silverberg SJ, Donovan D, Papadopoulos A, Staron RB, Adesso V, Jorgesen B, McGregor C, Schulman L.** Osteoporosis in lung transplantation candidates with end-stage pulmonary disease. *Am J Med.* 1996 Sep;101(3):262-9.
- Shead EF, Haworth CS, Gunn E, Bilton D, Scott MA, Compston JE.** Osteoclastogenesis during infective exacerbations in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Aug 1;174(3):306-11.
- Shead EF, Haworth CS, Condliffe AM, McKeon DJ, Scott MA, Compston JE.** Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) is expressed in human bone. *Thorax.* 2007 Jul;62(7):650-1.
- Shead EF, Haworth CS, Barker H, Bilton D, Compston JE.** Osteoclast function, bone turnover and inflammatory cytokines during infective exacerbations of cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2010 Mar;9(2):93-8.
- Sheppard DN, Welsh MJ.** Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev.* 1999 Jan;79(1 Suppl):S23-45.
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ.** Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 1997 Apr 18;89(2):309-19.
- Skerry TM.** The response of bone to mechanical loading and disuse: fundamental principles and influences on osteoblast/osteocyte homeostasis. *Arch Biochem Biophys.* 2008 May 15;473(2):117-23.

- Sloane PA, Rowe SM.** Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein repair as a therapeutic strategy in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med.* 2010 Nov;16(6):591-7.
- Snouwaert JN, Brigman KK, Latour AM, Malouf NN, Boucher RC, Smithies O, Koller BH.** An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting. *Science.* 1992 Aug 21;257(5073):1083-8.
- Sodek J, Ganss B, McKee MD.** Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11(3):279-303.
- Sood M, Hambleton G, Super M, Fraser WD, Adams JE, Mughal MZ.** Bone status in cystic fibrosis. *Arch Dis Child.* 2001 Jun;84(6):516-20.
- Song Y, Namkung W, Nielson DW, Lee JW, Finkbeiner WE, Verkman AS.** Airway surface liquid depth measured in ex vivo fragments of pig and human trachea: dependence on Na⁺ and Cl⁻ channel function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2009 Dec;297(6):L1131-40.
- Standaert TA, Boitano L, Emerson J, Milgram LJ, Konstan MW, Hunter J, Berclaz PY, Brass L, Zeitlin PL, Hammond K, Davies Z, Foy C, Noone PG, Knowles MR.** Standardized procedure for measurement of nasal potential difference: an outcome measure in multicenter cystic fibrosis clinical trials. *Pediatr Pulmonol.* 2004 May;37(5):385-92.
- Stephenson A, Jamal S, Dowdell T, Pearce D, Corey M, Tullis E.** Prevalence of vertebral fractures in adults with cystic fibrosis and their relationship to bone mineral density. *Chest.* 2006 Aug;130(2):539-44.
- Stotland PK, Radzioch D, Stevenson MM.** Mouse models of chronic lung infection with *Pseudomonas aeruginosa*: models for the study of cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2000 Nov;30(5):413-24.
- Stoltz DA, Meyerholz DK, Pezzulo AA, Ramachandran S, Rogan MP, Davis GJ, Hanfland RA, Wohlford-Lenane C, Dohrn CL, Bartlett JA, Nelson GA 4th, Chang EH, Taft PJ, Ludwig PS, Estin M, Hornick EE, Launspach JL, Samuel M, Rokhlina T, Karp PH, Ostedgaard LS, Uc A, Starner TD, Horswill AR, Brogden KA, Prather RS, Richter SS, Shilyansky J, McCray PB Jr, Zabner J, Welsh MJ.** Cystic fibrosis pigs develop lung disease and exhibit defective bacterial eradication at birth. *Sci Transl Med.* 2010 Apr 28;2(29):29ra31.
- Stutts MJ, Rossier BC, Boucher RC.** Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inverts protein kinase A-mediated regulation of epithelial sodium channel single channel kinetics. *J Biol Chem.* 1997 May 30;272(22):14037-40.
- Sun X, Sui H, Fisher JT, Yan Z, Liu X, Cho HJ, Joo NS, Zhang Y, Zhou W, Yi Y, Kinyon JM, Lei-Butters DC, Griffin MA, Naumann P, Luo M, Ascher J, Wang K, Frana T, Wine JJ, Meyerholz DK, Engelhardt JF.** Disease phenotype of a ferret CFTR-knockout model of cystic fibrosis. *J Clin Invest.* 2010 Sep;120(9):3149-60.
- Switzer M, Rice J, Rice M, Hardin DS.** Insulin-like growth factor-I levels predict weight, height and protein catabolism in children and adolescents with cystic fibrosis. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2009 May;22(5):417-24.
- Tabary O, Escotte S, Couetil JP, Hubert D, Dusser D, Puchelle E, Jacquot J.** Relationship between I κ B deficiency, NF κ B activity and interleukin-8 production in CF human airway epithelial cells. *Pflugers Arch.* 2001;443 Suppl 1:S40-4.
- Tang Y, Wu X, Lei W, Pang L, Wan C, Shi Z, Zhao L, Nagy TR, Peng X, Hu J, Feng X, Van Hul W, Wan M, Cao X.** TGF- β 1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat Med.* 2009 Jul;15(7):757-65.
- Taulan M, Girardet A, Guittard C, Altieri JP, Templin C, Beroud C, des Georges M, Claustres M.** Large genomic rearrangements in the CFTR gene contribute to CBAVD. *BMC Med Genet.* 2007 Apr 20;8:22.
- Taulan M, Guittard C, Theze C, Claustres M, Georges M.** A novel double deletion underscores the importance of characterizing end points of the CFTR large rearrangements. *Eur J Hum Genet.* 2009 Dec;17(12):1683-7.
- Teitelbaum SL.** Bone resorption by osteoclasts. *Science.* 2000 Sep 1;289(5484):1504-8.
- Teitelbaum SL, Ross FP.** Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet.* 2003 Aug;4(8):638-49.
- Teitelbaum SL.** Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *Am J Pathol.* 2007 Feb;170(2):427-35.
- Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR.** Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell.* 1981 Oct;26(1 Pt 1):99-105.
- Tizzano EF, Silver MM, Chitayat D, Benichou JC, Buchwald M.** Differential cellular expression of cystic fibrosis transmembrane regulator in human reproductive tissues. Clues for the infertility in patients with cystic fibrosis. *Am J Pathol.* 1994 May;144(5):906-14.

- Tomaiuolo R, Sangiuolo F, Bombieri C, Bonizzato A, Cardillo G, Raia V, D'Apice MR, Bettin MD, Pignatti PF, Castaldo G, Novelli G.** Epidemiology and a novel procedure for large scale analysis of CFTR rearrangements in classic and atypical CF patients: a multicentric Italian study. *J Cyst Fibros.* 2008 Sep;7(5):347-51.
- Tominaga M, Horie M, Okada Y.** Additional similarity of cardiac cAMP-activated Cl⁻ channels to CFTR Cl⁻ channels. *Jpn J Physiol.* 1994;44 Suppl 2:S215-8.
- Tran Van PT, Vignery A, Baron R.** Cellular kinetics of the bone remodeling sequence in the rat. *Anat Rec.* 1982 Apr;202(4):445-51.
- Traub W, Piez KA.** The chemistry and structure of collagen. *Adv Protein Chem* 1971;25:243-352.
- Traub W, Arad T, Weiner S.** Three-dimensional ordered distribution of crystals in turkey tendon collagen fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Dec;86(24):9822-6.
- Treiber A, Morand O, Clozel M.** The pharmacokinetics and tissue distribution of the glucosylceramide synthase inhibitor miglustat in the rat. *Xenobiotica.* 2007 Mar;37(3):298-314.
- Tsui LC, Buchwald M, Barker D, Braman JC, Knowlton R, Schumm JW, Eiberg H, Mohr J, Kennedy D, Plavsic N, Zsiga M, Markiewicz D, Akots G, Brouwn V, Helms C, Gravius T, Parker C, Rediker K, Donis-Keller H.** Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science.* 1985 Nov 29;230(4729):1054-7.
- Turnbull EL, Rosser MF, Cyr DM.** The role of the UPS in cystic fibrosis. *BMC Biochem.* 2007 Nov 22;8 Suppl 1:S11.
- Ujhelyi R, Treszl A, Vásárhelyi B, Holics K, Tóth M, Arató A, Tulassay T, Tulassay Z, Szathmári M.** Bone mineral density and bone acquisition in children and young adults with cystic fibrosis: a follow-up study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2004 Apr;38(4):401-6.
- van Bezooijen RL, Roelen BA, Visser A, van der Wee-Pals L, de Wilt E, Karperien M, Hamersma H, Papapoulos SE, ten Dijke P, Löwik CW.** Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med.* 2004 Mar 15;199(6):805-14.
- van Bezooijen RL, ten Dijke P, Papapoulos SE, Löwik CW.** SOST/sclerostin, an osteocyte-derived negative regulator of bone formation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005 Jun;16(3):319-27.
- van Bezooijen RL, Svensson JP, Eefting D, Visser A, van der Horst G, Karperien M, Quax PH, Vrieling H, Papapoulos SE, ten Dijke P, Löwik CW.** Wnt but not BMP signaling is involved in the inhibitory action of sclerostin on BMP-stimulated bone formation. *J Bone Miner Res.* 2007 Jan;22(1):19-28.
- van Doorninck JH, French PJ, Verbeek E, Peters RH, Morreau H, Bijman J, Scholte BJ.** A mouse model for the cystic fibrosis delta F508 mutation. *EMBO J.* 1995 Sep 15;14(18):4403-11.
- Van Goor F, Straley KS, Cao D, González J, Hadida S, Hazlewood A, Joubran J, Knapp T, Makings LR, Miller M, Neuberger T, Olson E, Panchenko V, Rader J, Singh A, Stack JH, Tung R, Grootenhuys PD, Negulescu P.** Rescue of DeltaF508-CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006 Jun;290(6):L1117-30.
- Van Goor F, Hadida S, Grootenhuys PD, Burton B, Cao D, Neuberger T, Turnbull A, Singh A, Joubran J, Hazlewood A, Zhou J, McCartney J, Arumugam V, Decker C, Yang J, Young C, Olson ER, Wine JJ, Frizzell RA, Ashlock M, Negulescu P.** Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Nov 3;106(44):18825-30.
- Van Goor F, Hadida S, Grootenhuys PD, Burton B, Stack JH, Straley KS, Decker CJ, Miller M, McCartney J, Olson ER, Wine JJ, Frizzell RA, Ashlock M, Negulescu PA.** Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Nov 15;108(46):18843-8.
- Vanderwel M, Hardin DS.** Growth hormone normalizes pubertal onset in children with cystic fibrosis. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2006 Mar;19(3):237-44.
- Varga K, Jurkuvenaite A, Wakefield J, Hong JS, Guimbellot JS, Venglarik CJ, Niraj A, Mazur M, Sorscher EJ, Collawn JF, Bebök Z.** Efficient intracellular processing of the endogenous cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in epithelial cell lines. *J Biol Chem.* 2004 May 21;279(21):22578-84.
- Vashishth D.** Hierarchy of bone microdamage at multiple length scales. *Int J Fatigue* 2007;29:1024-1033.
- Venier RE, Igdoura SA.** Miglustat as a therapeutic agent: prospects and caveats. *J Med Genet.* 2012 Sep;49(9):591-7.

- Verborgt O, Tatton NA, Majeska RJ, Schaffler MB.** Spatial distribution of Bax and Bcl-2 in osteocytes after bone fatigue: complementary roles in bone remodeling regulation? *J Bone Miner Res.* 2002 May;17(5):907-14.
- Vij N, Fang S, Zeitlin PL.** Selective inhibition of endoplasmic reticulum-associated degradation rescues DeltaF508-cystic fibrosis transmembrane regulator and suppresses interleukin-8 levels: therapeutic implications. *J Biol Chem.* 2006 Jun 23;281(25):17369-78.
- Vij N, Mazur S, Zeitlin PL.** CFTR is a negative regulator of NFkappaB mediated innate immune response. *PLoS One.* 2009;4(2):e4664.
- Wang X, Matteson J, An Y, Moyer B, Yoo JS, Bannykh S, Wilson IA, Riordan JR, Balch WE.** COPII-dependent export of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from the ER uses a di-acidic exit code. *J Cell Biol.* 2004 Oct 11;167(1):65-74.
- Ward CL, Omura S, Kopito RR.** Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell.* 1995 Oct 6;83(1):121-7.
- Ward L, Tricco AC, Phuong P, Cranney A, Barrowman N, Gaboury I, Rauch F, Tugwell P, Moher D.** Bisphosphonate therapy for children and adolescents with secondary osteoporosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007 Oct 17;(4):CD005324.
- Wei L, Vankeerberghen A, Cuppens H, Cassiman JJ, Droogmans G, Nilius B.** The C-terminal part of the R-domain, but not the PDZ binding motif, of CFTR is involved in interaction with Ca(2+)-activated Cl⁻ channels. *Pflugers Arch.* 2001 May;442(2):280-5.
- Weiner S, Wagner HD.** The material bone: Structure-mechanical function relations. *Annu Rev Mater Sci* 1998;28:271-298.
- Weiss DJ, Pilewski JM.** The status of gene therapy for cystic fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med.* 2003 Dec;24(6):749-70.
- Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, Trifillis P, Paushkin S, Patel M, Trotta CR, Hwang S, Wilde RG, Karp G, Takasugi J, Chen G, Jones S, Ren H, Moon YC, Corson D, Turpoff AA, Campbell JA, Conn MM, Khan A, Almstead NG, Hedrick J, Mollin A, Risher N, Weetall M, Yeh S, Branstrom AA, Colacino JM, Babiak J, Ju WD, Hirawat S, Northcutt VJ, Miller LL, Spatrack P, He F, Kawana M, Feng H, Jacobson A, Peltz SW, Sweeney HL.** PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature.* 2007 May 3;447(7140):87-91.
- Welsh MJ, Smith AE.** Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell.* 1993 Jul 2;73(7):1251-4.
- Welsh MJ, Smith AE.** Cystic fibrosis. *Sci Am.* 1995 Dec;273(6):52-9.
- Wilke M, Buijs-Offerman RM, Aarbiou J, Colledge WH, Sheppard DN, Touqui L, Bot A, Jorna H, de Jonge HR, Scholte BJ.** Mouse models of cystic fibrosis: phenotypic analysis and research applications. *J Cyst Fibros.* 2011 Jun;10 Suppl 2:S152-71.
- Wilschanski M, Miller LL, Shoseyov D, Blau H, Rivlin J, Aviram M, Cohen M, Armoni S, Yaakov Y, Pugatsch T, Cohen-Cymberek M, Miller NL, Reha A, Northcutt VJ, Hirawat S, Donnelly K, Elfring GL, Ajayi T, Kerem E.** Chronic ataluren (PTC124) treatment of nonsense mutation cystic fibrosis. *Eur Respir J.* 2011 Jul;38(1):59-69. Erratum in: *Eur Respir J.* 2011 Oct;38(4):996
- Wiuf C.** Do delta F508 heterozygotes have a selective advantage? *Genet Res.* 2001 Aug;78(1):41-7.
- Whyte MP, McAlister WH, Novack DV, Clements KL, Schoenecker PL, Wenkert D.** Bisphosphonate-induced osteopetrosis: novel bone modeling defects, metaphyseal osteopenia, and osteosclerosis fractures after drug exposure ceases. *J Bone Miner Res.* 2008 Oct;23(10):1698-707.
- Wolfenden LL, Judd SE, Shah R, Sanyal R, Ziegler TR, Tangpricha V.** Vitamin D and bone health in adults with cystic fibrosis. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2008 Sep;69(3):374-81.
- Wong HR, Ryan M, Wispé JR.** Stress response decreases NF-kappaB nuclear translocation and increases I-kappaBalpha expression in A549 cells. *J Clin Invest.* 1997 May 15; 99(10): 2423-2428.
- Yakar S, Rosen CJ, Beamer WG, Ackert-Bicknell CL, Wu Y, Liu JL, Ooi GT, Setser J, Frystyk J, Boisclair YR, LeRoith D.** Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *J Clin Invest.* 2002 Sep;110(6):771-81.
- Yakar S, Canalis E, Sun H, Mejia W, Kawashima Y, Nasser P, Courtland HW, Williams V, Bouxsein M, Rosen C, Jepsen KJ.** Serum IGF-1 determines skeletal strength by regulating subperiosteal expansion and trait interactions. *J Bone Miner Res.* 2009 Aug;24(8):1481-92.

Yan Q, Sage EH. SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions. *J Histochem Cytochem.* 1999 Dec;47(12):1495-506.

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinoshita M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yanaguchi K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Mar 31;95(7):3597-602.

Zhang M, Xuan S, Buxsein ML, von Stechow D, Akeno N, Faugere MC, Malluche H, Zhao G, Rosen CJ, Efstratiadis A, Clemens TL. Osteoblast-specific knockout of the insulin-like growth factor (IGF) receptor gene reveals an essential role of IGF signaling in bone matrix mineralization. *J Biol Chem.* 2002 Nov 15;277(46):44005-12.

Zhang XM, Wang XT, Yue H, Leung SW, Thibodeau PH, Thomas PJ, Guggino SE. Organic solutes rescue the functional defect in delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem.* 2003 Dec 19;278(51):51232-42.

Zhao G, Monier-Faugere MC, Langub MC, Geng Z, Nakayama T, Pike JW, Chernausk SD, Rosen CJ, Donahue LR, Malluche HH, Fagin JA, Clemens TL. Targeted overexpression of insulin-like growth factor I to osteoblasts of transgenic mice: increased trabecular bone volume without increased osteoblast proliferation. *Endocrinology.* 2000 Jul;141(7):2674-82.

Zhou Z, Wang X, Liu HY, Zou X, Li M, Hwang TC. The two ATP binding sites of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) play distinct roles in gating kinetics and energetics. *J Gen Physiol.* 2006 Oct;128(4):413-22.

Zeitlin PL, Boyle MP, Guggino WB, Molina L. A phase I trial of intranasal Moli1901 for cystic fibrosis. *Chest.* 2004 Jan;125(1):143-9.

Sites internet :

Inspire Pharmaceutical : www.seekingalpha.com ou www.news-medical.net

Science.ca

sfr.larhumatologie.fr

www.cff.org

www.dossierfamilial.com

www.genet.sickkids.on.ca

www.legifrance.gouv.fr

www.MedecineNet.com

www.pneumo-adeq2.org

www.ptcbio.com

www.vaincrelamuco.com

The F508del mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*Cftr*) gene is believed to be an independent risk factor for cystic fibrosis-related bone disease.

We evaluated the bone mineral density and histomorphometric parameters of bone formation and bone mass in F508del-CFTR homozygous mice (F508del) and littermate (WT) controls at 6 (prepubertal), 10 (pubertal) and 14 (young adult) weeks of age in two genders. The bone architecture of F508del and WT mice was evaluated by bone densitometry, micro-CT and analysis of dynamic parameters of bone formation. Levels of serum insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and osteocalcin were also determined. Reduced bone mineral density, lower femoral bone mass and altered trabecular bone architecture were observed in F508del compared to controls at 6, 10, and 14 weeks of age. A decrease in bone formation rate in F508del was evidenced compared to control mice, independently of age and sex. Additionally, we found lower IGF-1 levels in F508del mice compared to WT mice whereas osteocalcin level was normal. Our findings demonstrate that the F508del mutation in CFTR impacts trabecular bone mass by reducing bone formation.

N-butyldeoxynojirimycin (NB-DNJ, miglustat [Zavesca], Laboratoires Actelion, Suisse) an approved drug for treating bone pathology in type I Gaucher disease, was reported to normalize sodium and *Cftr*-dependent chloride transport in nasal mucosa of F508del cystic fibrosis mice. The bone microarchitecture of F508del mice relative to WT littermates was evaluated after an administration of 120 mg/kg/day miglustat by oral gavage for 28 days. Levels of serum IGF-1 and 17 β -estradiol (E₂) were also determined. Once-day treatments with miglustat, over 4 weeks, normalized trabecular bone volume of the lumbar spine in F508del mice. This increase of bone volume was related to both an increased rate of bone formation and increased serum E₂ level but not IGF-1 level in miglustat-treated F508del mice compared to untreated F508del mice.

Our data provides clear evidence that oral administration of miglustat normalizes bone mass by increasing bone formation in F508del mice; these findings strongly support the therapeutic potential of miglustat in patients with cystic fibrosis related bone disease.

Key words : cystic fibrosis, bone disease, miglustat

La mutation F508del dans le gène *Cftr* (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) est considérée comme un facteur de risque indépendant de la maladie osseuse dans la mucoviscidose.

Nous avons évalué la densité minérale osseuse et les paramètres histomorphométriques de la formation osseuse et de la masse osseuse chez des souris homozygotes F508del-CFTR (souris F508del, modèle murin de la mucoviscidose) et des souris contrôles (souris WT), âgées de 6 semaines (pré-pubères), 10 semaines (pubères) et 14 semaines (jeunes adultes), dans les deux sexes. L'architecture osseuse des souris F508del et WT a été évaluée par densitométrie osseuse et par micro-tomographie (µCT) et l'analyse des paramètres dynamiques de la formation osseuse a été réalisée par la méthode de double marquage (tétracycline et calcéine), *in vivo*. Les taux sériques de l'insuline-like growth factor 1 (IGF-1) et de l'ostéocalcine ont également été déterminés.

Une diminution de la densité minérale osseuse, de la masse osseuse et une altération de l'architecture osseuse trabéculaire fémorale et vertébrale ont été observées chez les souris F508del par rapport aux souris WT à 6, 10 et 14 semaines. Une diminution du taux de la formation osseuse chez la souris F508del a été mise en évidence, indépendamment de l'âge et du sexe de la souris. En outre, nous avons observé un taux sérique d'IGF-1 plus faible chez la souris F508del par rapport aux souris WT, alors que le taux sérique d'ostéocalcine n'est pas différent. Nos résultats montrent pour la première fois que la mutation F508del dans le gène *Cftr* réduit la masse osseuse trabéculaire en diminuant la formation osseuse.

Le N-butyldeoxynojirimicin (NB-DNJ, le miglustat (Zavesca®) des Laboratoires Actelion, Suisse) est un médicament approuvé pour le traitement de la pathologie osseuse de la maladie de Gaucher de type I. Il a été récemment montré que le miglustat normalise le transport des ions chlorures et sodiques au niveau de la muqueuse nasale des souris F508del. La formation osseuse et la microarchitecture osseuse de la souris F508del ont été évaluées après l'administration du miglustat à une dose de 120 mg/kg/jour qui a été réalisée par un gavage quotidien pendant 28 jours. Les taux sériques d'IGF-1 et de 17β-estradiol (E2) ont également été déterminés. Nos résultats montrent clairement que le traitement de 4 semaines avec le miglustat normalise le volume osseux trabéculaire des vertèbres lombaires de la souris F508del. Cette augmentation du volume osseux est associée à une augmentation du taux de la formation osseuse et une augmentation du taux sérique d'E2, mais pas d'IGF-1 chez les souris F508del traitées par rapport aux souris F508del non traitées.

Cette étude pré-clinique à visée thérapeutique a montré que l'administration orale du miglustat normalise la masse osseuse par une augmentation de la formation osseuse chez des souris F508del. Ces résultats témoignent d'un fort potentiel thérapeutique du miglustat chez les patients atteints de la maladie osseuse associée à la mucoviscidose.

Mots clé : Mucoviscidose, maladie osseuse, miglustat, souris F508del