

## Table des matières

Résumé.....	III
Abstract.....	V
Table des matières.....	VII
Liste des figures.....	IX
Liste des tableaux.....	X
Abréviations.....	XI
Remerciements.....	XVI
Avant-propos.....	XVIII
<b>Chapitre 1 : INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. L'anémie de Fanconi.....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Historique et contexte.....	1
1.1.2. Génétique moléculaire.....	1
1.1.3. Diagnostic.....	3
1.1.4. Les signes cliniques.....	4
1.1.4.1. Pathologies hématologiques.....	4
1.1.4.2. Cancers solides.....	7
1.1.4.3. Malformations congénitales.....	7
1.1.5. Traitements.....	10
<b>1.2. DKK1.....</b>	<b>11</b>
<b>1.3. Le tissu osseux.....</b>	<b>12</b>
1.3.1. Structure.....	13
1.3.1.1. Macrostructure.....	13
1.3.1.2. Microstructure.....	14
1.3.1.3. Ultrastructure.....	17
1.3.2. Composition cellulaire du tissu osseux.....	18
1.3.2.1. Les cellules osseuses.....	18
1.3.2.2. Les cellules souches du tissu osseux et leur régulation.....	21
1.3.3. Développement.....	27
1.3.3.1. Ostéogenèse.....	27
1.3.3.2. Croissance.....	30
1.3.3.3. Le remodelage osseux.....	31
1.3.4. Le tissu osseux dans l'anémie de Fanconi.....	33
<b>1.4. Hypothèse de travail.....</b>	<b>37</b>
<b>Chapitre 2 : Modulating Dickkopf-1: A Strategy to Monitor or Treat Cancer?.....</b>	<b>39</b>
2.1. Résumé.....	41
2.2. Abstract.....	42
2.3. Introduction.....	43
2.4. DKK1 Gene Expression and Protein Structure.....	43
2.5. DKK1 Protein Function in Development.....	44
2.6. DKK1 as a Biomarker of Cancer Initiation and Progression.....	45
2.7. Conclusions.....	47
2.8. Acknowledgments.....	48
2.9. Conflicts of Interest.....	48

2.10. References .....	48
<b>Chapitre 3 : Deletion of the Fanconi Anemia C Gene in Mice Leads to Skeletal Anomalies, Defective Bone Mineralisation and Microarchitecture.....</b>	<b>54</b>
3.1. Résumé.....	56
3.2. Abstract.....	57
3.3. Introduction .....	58
3.4. Materials and Methods .....	59
3.5. Results .....	62
3.6. Discussion.....	67
3.7. Acknowledgments .....	70
3.8. Disclosure statement.....	70
3.9. References.....	70
3.10. Figures.....	73
3.11. Tables .....	82
3.12. Supplementary Data.....	83
<b>Chapitre 4 : Discussion et conclusion.....</b>	<b>90</b>
4.1. Caractérisation du développement squelettique embryonnaire .....	90
4.2. Intégrité et activité métabolique du tissu osseux chez la souris adulte .....	92
4.3. Défauts osseux et mécanismes sous-jacents .....	94
<b>Références.....</b>	<b>98</b>

## Liste des figures

### CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Figure 1.1 : Caryotype de lymphocytes de patients Fanconi traités à la mitomycine C. ....	4
Figure 1.2 : L'hématopoïèse. ....	5
Figure 1.3 : Coupe de moelle osseuse de souris. ....	6
Figure 1.4 : Patient de trois ans présentant des caractéristiques classiques du phénotype Fanconi. ....	8
Figure 1.5 : Structure générale d'un humérus humain. ....	13
Figure 1.6 : Représentation schématique de la structure du tissu réticulaire. ....	14
Figure 1.7 : Représentation schématique de la structure du tissu osseux trabéculaire. ....	15
Figure 1.8 : Représentation schématique de la structure de l'os cortical. ....	16
Figure 1.9 : Ostéoblastes. ....	19
Figure 1.10 : Ostéocytes piégés dans leur lacune au sein de l'os minéralisé. ....	20
Figure 1.11 : Ostéoclaste multinucléé digérant de l'os minéralisé. ....	21
Figure 1.12 : Régulation de la différenciation mésenchymateuse par Runx2 et la voie de signalisation Wnt. ....	23
Figure 1.13 : Régulation génique de l'engagement des cellules souches mésenchymateuses vers la lignée ostéoblastique ou chondrocytaire. ....	24
Figure 1.14 : Régulation moléculaire de la différenciation ostéoclastique. ....	26
Figure 1.15 : Processus d'ossification endochondrale. ....	29
Figure 1.16 : Le cartilage de conjugaison. ....	30
Figure 1.17 : Représentation schématique d'une unité de remodelage osseux. ....	32
Figure 1.18 : Radiographie de la main gauche d'un patient atteint de l'anémie de Fanconi. ....	34

### CHAPITRE 3 : Deletion of the Fanconi Anemia C Gene in Mice Leads to Skeletal Anomalies, Defective Bone Mineralisation and Microarchitecture

Figure 3.1 : Skeletal development of <i>FancC</i> <sup>-/-</sup> embryos. ....	74
Figure 3.2 : Bone microarchitecture and histomorphometry parameters of <i>FancC</i> <sup>-/-</sup> mice. ....	76
Figure 3.3 : Three-point Bending test and Gene expression profile of <i>FancC</i> <sup>-/-</sup> . ....	78
Figure 3.4 : Number, differentiation abilities and expression profile of <i>FancC</i> <sup>-/-</sup> bone marrow-derived stromal cells. ....	80
Figure S3.1. Mineralization delay in <i>FancC</i> <sup>-/-</sup> and <i>FancA</i> <sup>-/-</sup> mice. ....	83
Figure S3.2. Skeletal development of <i>FancA</i> <sup>-/-</sup> embryos. ....	85
Figure S3.4. Phenotypic profile and differentiation abilities of <i>FancA</i> <sup>-/-</sup> bone marrow stromal cells. ....	87

## Liste des tableaux

### CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Tableau 1.1 : Liste des 22 gènes Fanconi. ....	2
Tableau 1.2 : Prévalence des gènes Fanconi chez les patients.....	3
Tableau 1.3 : Malformations congénitales et fréquences retrouvées chez les patients Fanconi...9	

### CHAPITRE 3 : Deletion of the Fanconi Anemia C Gene in Mice Leads to Skeletal Anomalies, Defective Bone Mineralisation and Microarchitecture

Table 3.1 : Distribution of offspring from <i>FancC</i> <sup>+/-</sup> and <i>FancA</i> <sup>+/-</sup> intercrosses. ....	82
Table S3.1 : List of RT-qPCR primers.....	89

## Abréviations

$\beta$  : Beta  
 $\alpha$  : Alpha  
 $\Delta$  : Delta  
 $\gamma$  : Sigma  
 $\mu$  : Micro  
ACTB : Beta-actin  
ADN : Acide DesoxyriboNucleotidique  
AF : Anémie de Fanconi  
AFP : Alpha-Foetoprotein  
ALP : Alkaline phosphatase  
ANOVA : Analysis Of Variance  
ASBMR : American Society for Bone and Mineral Research  
B2M : Beta-2 Microglobulin  
BMD : Bone Mineral Density  
BMC : Bone mineral Content  
BM-MSCs : Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells  
BMPs : Bone Morphogenic Proteins  
BMP-2 : Bone Morphogenic Protein-2  
BMSC : Bone Marrow Stromal Cells  
BRCA1 : Breast Cancer 1  
BRCA2 : Breast Cancer 2  
BRIP1 : BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1  
BSA : Bovine Serum Albumine  
BV : Bone Volume  
C/ebpa : CCAAT/enhancer-binding protein alpha  
CCD : Charge-coupled device  
CD-140 : Cluster of Differentiation 140  
CDH2 : Cadherine-2  
CFU-F : Fibroblast Colony-Forming Units  
CIHR : Canadian Institutes of Health Research

CLP : Common lymphoid progenitor  
COL1a1 : Collagen type I alpha-1 chain  
COL2a1 : Collagen type II alpha 1 chain  
CRD : Cysteine-Rich Domain  
CSM : Cellules Souches Mésenchymateuses  
CT: Computed Tomography  
CYCLD1 : Cyclin D1  
DAPI : Di Aminido Phenyl Indol  
DKK-1 : Dickkopf-1  
DKKL1: Dickkopf-Like 1  
DPC : Days Post gestation  
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay  
ERCC4 : Excision Repair Cross-Complementation group 4  
FANC : Fanconi Anemia protein (A to W)  
FA : Fanconi Anemia  
FBS : Fetal Bovine Serum  
FC : Fanconi C  
GATA2 : GATA-binding protein 2  
G-CSF : Granulocyte-Colony-Stimulating Factor  
Geomean : Geometric mean  
GMLP : Granulocyte-Macrophage-Lymphocyte Progenitor  
GMP : Granulocyte-Macrophage Progenitor  
HBV : Hepatitis B Virus  
HCC : Hepatocellular Carcinoma  
HE : Heterozygous  
HO : Homozygous  
HSC : Hematopoietic Stem Cells  
HSCT : Hematopoietic Stem Cell Transplantation  
IBMFS : Inherited Bone Marrow Failure Syndromes  
IGF-1 : insulin-like growth factor-1  
KOH : Hydroxyde de potassium  
KRM1/2 : Kremen-1 or 2

LT-HSC : Long-Term Hematopoietic Stem Cells  
LRP5/6 : Low-density lipoprotein Receptor-related Protein 5/6  
M-CSF : Macrophage Colony-Stimulating Factor  
MAD2L2 : Mitotic Arrest Deficient 2 like 2  
MEP : Megakaryocyte-Erythrocyte Progenitor  
MM : Multiple Myeloma  
MPP : Multipotent Progenitor  
MS : Mineralized Surface  
NK : Natural Killer  
OPN : Osteopontin  
OCN : Osteocalcin  
OPG : Osteoprogenin  
OS : Osteosarcoma  
OS : Osteoid Surface  
OV : Osteoid Volume  
PALB2 : Partner And Localizer of BRCA2  
PBS : Phosphate Buffer Saline  
PFA : Paraformaldéhyde  
PPAR $\gamma$  : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma  
qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction  
RAD51C : RAD51 paralog C  
RANK : Receptor for Activation of Nuclear factor Kappa B  
RANKL : Receptor for Activation of Nuclear factor Kappa B (NF-KB) (RANK) Ligand  
RFWD3 : Ring finger and WD repeat domain 3  
RNA : RiboNucleic Acid  
RO : Red Oil  
RT : Reverse Transcriptase  
RUNX2 : Runt-related transcription factor 2  
SCA-1 : Stem Cells Antigen-1  
SCCHN : Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck  
SD : Standard Deviation  
SDHA : Succinate Dehydrogenase complex, subunit A

SEM : Standard Error of the Mean

SOST : Sclerostin

SOX9 : SRY (sex determining region Y)-box 9

ST-HSC : Short-Term Hematopoietic Stem Cells

TCF : T-Cell Factor

TRAP : Tartrate-Resistant Acid Phosphatase type 5

TV : Tissue Volume

UBE2T : Ubiquitin conjugating enzyme E2 T

WT : Wild-Type

XRCC2 : X-ray repair cross complementing 2

XRCC9 : X-Ray Repair, Complementing Defective, In Chinese Hamster, 9



À Madeleine et Jacinthe,  
Puisse le fruit de ce travail vous réunir.

**“Certainty of death,  
small chance of success,  
what are we waiting for?”**

*Lord of the Rings: The Return of the King*  
by J.R.R. Tolkien

**“FA means fight always and find answers.”**

**Matt Pearl, FARF 2017**

## Remerciements

Un peu, beaucoup, passionnément, à la folie,  
À tous ceux qui m'ont accompagné jusque qu'ici,  
J'aimerais vous dire merci.

À ma directrice de thèse, Madeleine Carreau,  
Merci de m'avoir aidé et laissé toute la liberté qu'il faut  
Pour mener mes projets fous, sans jamais poser de véto.

Aux personnes incroyables, dont on ne parle que trop peu,  
Gentils, extrêmement compétents et tellement méticuleux !  
Sylvain, Jacinthe, Visal : les professionnels merveilleux !

À la team trop sympa de l'animalerie,  
J'aimerais aussi faire un gros big up et dire merci,  
À France, Nathalie, Mathieu, Karine, Denis, Sonia, René et Cathy.

Sorties de nulle part il y a ces gens qui un jour,  
M'ont tendu la main, m'ont écouté, aidé ou ont tout fait pour,  
Merci à Pascal, Georges, Fabrice, Jérôme, Steve, Jessica et Catherine d'avoir égayé le parcours !

À la gang des crinkés, the one and only,  
Qui enflamment le bloc P depuis notre salle de lunch, enfin, notre laverie,  
Merci car sans vous, même la cuisse de poulet de givré n'a plus le gout de la vie.

Une section spéciale pour ces gens d'exception,  
Qui à 6000 bornes de chez moi, me font me sentir à la maison,  
Mathilde, Maud, Jacinthe, Julia, Anto, Germain, Mona, la team Pavia et le frangin Mazon  
Mes madeleines de Proust, que dis-je, mes pélardons !

Et de l'autre côté du monde, merci à la mi-fa !  
Celle du cœur, des lettres pleines d'amour et du chocolat,  
Qui, dans la joie comme dans la douleur, a toujours été là.  
Merci à mes sœurs chéries, Tom, Chris, feu mon Pépé, feu Tonton Antoine, Mémé, Tata,  
TontonBB, Nanie, Maman et Papa.

Merci à toutes mes pino-co dont je suis crak love depuis...  
À mon âge ça ne se dit plus, bon ok certaines depuis 22 ans et 9 mois et demi,  
À Klr, Ariane, les VMs et leur ptit sguis, sans oublier la femme de ma vie,  
Pour les sessions SOS, les recettes de déo et les conversations inspirantes sur le sens du sguis

Et parce que sans lui, plus rien n'a de saveur,  
Ni les résultats positifs, ni les croissants au beurre,  
Qu'il est la raison pour laquelle je le referais,  
Sans conditionnelle, juste pour à nouveau le rencontrer.  
On m'avait dit que le doctorat c'est tous les jours lundis,  
Mais dans ses bras à lui, c'est dimanche à l'infini.

Merci Chouchou.

## Avant-propos

### Notes introductives :

Le premier chapitre de cette thèse est une revue de la littérature permettant d'introduire mon sujet de doctorat. Au sein de ce chapitre se trouve une partie consacrée à la fonction et au mode d'action de la protéine Dickkopf-1. Ce sujet ayant fait l'objet d'une publication de revue de littérature par notre laboratoire, ladite revue a été ajoutée dans ce manuscrit. Elle est retrouvée sous forme d'article dans le chapitre 2 de cette thèse. Le corps du chapitre 3 présente les résultats des expériences qui ont été menées dans le cadre de mon projet de recherche. Il est également structuré sous forme d'article. La numérotation des figures et des tableaux des articles a été modifiée pour une intégration adéquate dans le manuscrit.

Les articles inclus dans cette thèse ont été réalisés dans le laboratoire du Dre Carreau durant les quatre années de mon doctorat. Ils s'inscrivent parfaitement dans le cadre de mon projet de recherche. Sur chacun de ces articles, mon statut est celui du premier auteur.

### Contributions :

Le premier article, objet du chapitre 2, est une revue de littérature qui a été conçue par le Dre Carreau et moi-même. Elle porte le titre : *Modulating Dickkopf-1: A Strategy to Monitor or Treat Cancer?* et a été publiée dans le journal *Cancers* en 2016. L'écriture a été faite en collaboration avec les Dre Delphine Masi et Madeleine Carreau ainsi que moi-même. Le Dre Carreau a effectué les corrections du manuscrit.

Le second article est l'objet du chapitre 3. Il s'agit d'une étude qui a été réalisée chez les modèles murins Fanconi *FancA*<sup>-/-</sup> et *FancC*<sup>-/-</sup> en collaboration avec les équipes de recherche des Dr Jérôme Frénette, Fabrice Mac-Way et Madeleine Carreau. Il porte le titre : *Bone developmental defects in Fanconi mice*. Il fera l'objet d'une publication dans les prochaines semaines. Pour cette étude, le projet expérimental a été conçu par les Dr Mac-Way, Carreau et par moi-même. L'ensemble des expériences ont été réalisées par Jacinthe Julien, Roth-Ung Visal, Sylvain Picard, Dounia Hamoudi et moi-même. Les données ont été analysées et interprétées par les Dr Mac-Way, Carreau et par moi-même. La Dre Carreau et moi avons écrit le manuscrit qui a été relu et approuvé par tous les auteurs de l'article.

# Chapitre 1 : INTRODUCTION

## 1.1. L'anémie de Fanconi

### 1.1.1. Historique et contexte

Presque un siècle s'est écoulé depuis la première description dans la littérature scientifique d'un cas clinique de l'anémie de Fanconi (Guido Fanconi 1927). C'est en 1927 que cette maladie rare causée par un défaut de réparation des ponts inter-brins de l'ADN a été identifiée pour la première fois par le pédiatre suisse Guido Fanconi chez trois jeunes patients, issus de la même fratrie, affectés par une forme particulière d'anémie associée à des malformations congénitales (Lobitz and Velleuer 2006). Depuis, grâce à la découverte et la caractérisation des nombreux gènes et mutations impliqués, l'anémie de Fanconi est passée d'un statut de cas clinique isolé à celui de la forme génétique d'aplasie médullaire la plus répandue (Alter et al. 2016; Shimamura and Alter 2010). Les dernières études épidémiologiques évaluent son incidence à 1/260 000 naissances aux États-Unis (Rosenberg, Tamary, and Alter 2011), avec un biais du sexe-ratio en faveur des hommes (1.2 : 1) (Alter 2003a). Bien que toutes les populations soient affectées par l'anémie de Fanconi (Fanconi Anemia Research Fund 2014), on observe des variations dans la fréquence des hétérozygotes en fonction de la population étudiée : 1/181 en Amérique du Nord, inférieure à 1/100 dans les populations où l'on retrouve des mutations fondatrices (ex : gitans espagnols, juifs ashkénazes) (Rosenberg et al. 2011). Alors que les individus hétérozygotes sont des porteurs sains, les patients Fanconi vont précocement être atteints d'hémopathies et de cancers et nombre d'entre eux n'atteindront pas l'âge de 40 ans (Alter et al. 2016; Auerbach 2009).

### 1.1.2. Génétique moléculaire

À ce jour, vingt-deux gènes Fanconi ont été identifiés (Tableau 1.1) (Knies et al. 2017; Palovcak et al. 2017). Ils codent pour des protéines impliquées dans la voie de signalisation Fanconi/BRCA2 (Rodríguez and D'Andrea 2017). Cette dernière est impliquée dans la réparation des ponts inter-brins lors de la réplication de l'ADN. Lorsque la réplication de l'ADN est bloquée suite à la présence d'un pontage inter-brins, les protéines Fanconi vont former des complexes et se regrouper de façon séquentielle au site de lésion. Une cascade d'activation protéique est alors initiée, permettant la relaxation de l'ADN et le recrutement de protéines

effectrices qui vont réparer la lésion et permettre la reprise de la réplication (Gueiderikh, Rosselli, and Neto 2017; Rodríguez and D'Andrea 2017).

**Tableau 1.1 : Liste des 22 gènes Fanconi.** Symboles, différentes nomenclatures et locus des gènes de la voie de signalisation de Fanconi/BRCA2.

Symbole	Nom	Locus
<b>FANCA</b>	FANCA	16q24.3
<b>FANCB</b>	FANCB	Xp22.2
<b>FANCC</b>	FANCC	9q22.32
<b>FANCD1/BRCA2</b>	FANCD1 / <i>Breast Cancer 2, DNA repair associated</i>	13q13.1
<b>FANCD2</b>	FANCD2	3p25.3
<b>FANCE</b>	FANCE	6p21.31
<b>FANCF</b>	FANCF	11p14.3
<b>FANCG/XRCC9</b>	FANCG / <i>X-Ray Repair, Complementing Defective, In Chinese Hamster, 9</i>	9p13.3
<b>FANCI</b>	FANCI	15q26.1
<b>FANCIJ/BRIP1</b>	FANCIJ / <i>BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1</i>	17q23.2
<b>FANCL</b>	FANCL	2p16.1
<b>FANCM</b>	FANCM	14q21.2
<b>FANCN/PALB2</b>	FANCN / <i>Partner and localizer of BRCA2</i>	16p12.2
<b>FANCO/RAD51C</b>	FANCO / <i>RAD51 paralog C</i>	17q22
<b>FANCP/SLX4</b>	FANCP / <i>SLX4 structure-specific endonuclease subunit</i>	16p13.3
<b>FANCO/ERCC4</b>	FANCO / <i>ERCC excision repair 4, endonuclease catalytic subunit</i>	16p13.12
<b>FANCR/RAD51</b>	FANCR / <i>RAD51 recombinase</i>	15q15.1
<b>FANCS/BRCA1</b>	FANCS / <i>BRCA1, DNA repair associated</i>	17q21.31
<b>FANCT/UBE2T</b>	FANCT / <i>Ubiquitin conjugating enzyme E2 T</i>	1q32.1
<b>FANCU/XRCC2</b>	FANCU / <i>X-ray repair cross complementing 2</i>	7q36.1
<b>FANCV/MAD2L2/REV7</b>	FANCV / <i>Mitotic arrest deficient 2 like 2</i>	1p36.22
<b>FANCW/RFWD3</b>	FANCW / <i>Ring finger and WD repeat domain 3</i>	16q23.1

L'absence ou perte de fonction d'une seule des protéines Fanconi altère la fonctionnalité de cette voie de réparation et conduit à une forte instabilité génomique (Federico et al. 2017; Rodríguez and D'Andrea 2017).

Les mutations retrouvées chez les patients sont principalement autosomiques, à l'exception de celles du gène *FANCB* qui est localisé sur le chromosome X (Ameziane et al. 2015; Meetei et al. 2004). La majorité des patients Fanconi (80 %) sont porteurs de mutations dans les gènes *FANCA*, *FANCC* ou *FANCG* (Tableau 1.2) (Alter et al. 2016; Shimamura and Alter 2010).

**Tableau 1.2 : Prévalence des gènes Fanconi chez les patients.** \* Fréquence déterminée par les auteurs à partir de l'analyse d'études de cas publiées (Shimamura and Alter 2010). \*\* Fréquence calculée dans une cohorte de patients atteints de l'anémie de Fanconi et de cancer (Alter et al. 2016).

<b>Gène</b>	<b>% de patients (Shimamura and Alter 2010)*</b>	<b>% de patients (Alter 2016) **</b>
<b>FANCA</b>	<b>60</b>	<b>43</b>
FANCB	2	1
<b>FANCC</b>	<b>14</b>	<b>12</b>
FANCD1/BRCA2	3	2
FANCD2	3	4
FANCE	3	
FANCF	2	1
<b>FANCG/XRCC9</b>	<b>10</b>	<b>4</b>
FANCI	1	2
FANCI/BACH1/BRIP1	2	2
FANCL	0,2	
FANCM	0,2	
FANCN/PALB2	0,7	
<b>Nombre de patients</b>	<b>631</b>	<b>163</b>

Il existe encore actuellement des patients Fanconi n'ayant aucune mutation dans les gènes Fanconi connus. Une observation qui laisse présumer que d'autres gènes impliqués dans cette voie de signalisation restent encore à découvrir. Mais l'identité de tous les gènes Fanconi n'est pas l'unique source de mystère entourant cette maladie. Un nombre grandissant d'études mettent en évidence l'implication des protéines Fanconi en dehors de la voie de signalisation Fanconi/BRCA2 notamment dans le métabolisme oxydatif et l'autophagie des virus (Cheung and Taniguchi 2017; Sumpter and Levine 2017).

### 1.1.3. Diagnostic

Dès l'apparition de soupçons d'une anémie de Fanconi, un test de cassure chromosomique est effectué sur des leucocytes ou fibroblastes de patients. La spécificité de ce test repose sur la sensibilité des cellules des patients Fanconi aux agents pontant de l'ADN, tel que la mitomycine C (Schuler, Kiss, and Fabian 1969). Les cellules Fanconi ayant un défaut de réparation de l'ADN, le traitement de leucocytes ou fibroblastes de patients Fanconi par un agent pontant de l'ADN va induire une augmentation drastique des cassures chromosomiques (Figure 1.1) (Cervenka, Arthur, and Yasis 1981).



**Figure 1.1 : Caryotype de lymphocytes de patients Fanconi traités à la mitomycine C.** De nombreuses cassures et figures radiales sont présentes sur les chromosomes métaphasiques (Lee et al. 2012), copyright : cc by-nc-sa 3.0.

Une analyse de séquençage est ensuite effectuée afin d'identifier le gène muté responsable de la pathologie (Fargo et al. 2014). Cependant, malgré la robustesse de ce test de dépistage, certains patients ne sont diagnostiqués que très tardivement, lors de l'apparition de troubles hématologiques, de cancers ou lorsque des membres de leur famille sont diagnostiqués (Mehta and Tolar 1993). Ce dépistage tardif est dû à la faible pénétrance de l'anémie de Fanconi et constitue une réelle problématique pour les patients dont la prise en charge précoce améliore drastiquement les chances de survie à long terme (Bierings et al. 2018; Khan, Rosenberg, and Alter 2016; MacMillan and Wagner 2010; Peffault de Latour et al. 2013).

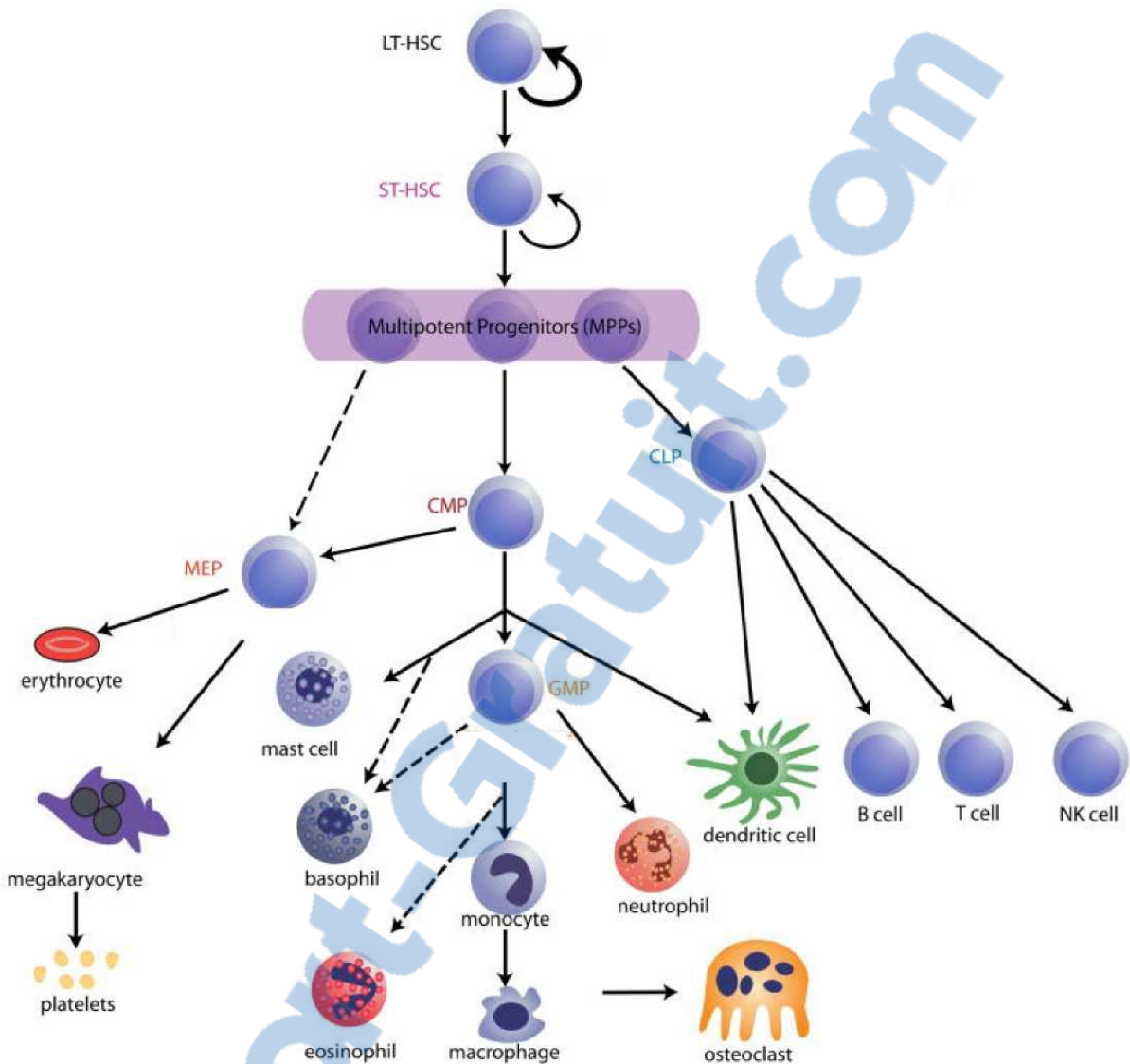
#### **1.1.4. Les signes cliniques**

Il existe une très grande variabilité phénotypique chez les patients Fanconi. Toutefois, les troubles hématologiques (cytopénie, macrocytose et anémie) sont souvent les premières manifestations cliniques de cette pathologie et requièrent une prise en charge immédiate des patients (Auerbach 2009; Mehta and Tolar 1993; Shimamura and Alter 2010).

##### **1.1.4.1. Pathologies hématologiques**

L'anémie de Fanconi est une pathologie qui affecte préférentiellement les cellules souches hématopoïétiques. Ces cellules sont situées dans la moelle osseuse hématopoïétique (moelle osseuse rouge). Leur différenciation permet la production de l'ensemble des types cellulaires sanguins. Leur prolifération clonale permet de maintenir cette production tout au long de la vie (Figure 1.2) (Eaves 2015).



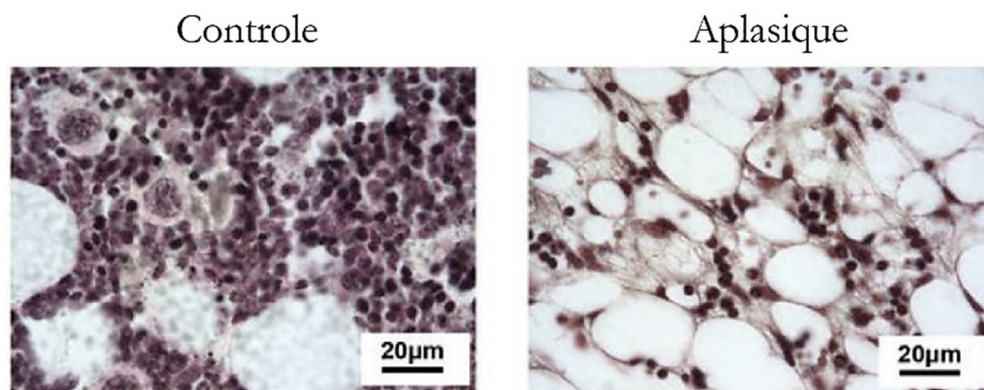


**Figure 1.2 : L'hématopoïèse.** En dehors des périodes de quiescence, les cellules souches hématopoïétiques (HSC) peuvent orienter leur division cellulaire à des fins d'auto-renouvellement ou de différenciation en cellules progénitrices (MPP, progéniteurs multipotents). À la suite de la différenciation, les progéniteurs vont alors proliférer et se différencier à leur tour, permettant ainsi la mobilisation ou le renouvellement des cellules sanguines. GMLP, progéniteurs de granulocytes, macrophages et lymphocytes; CLP, progéniteurs lymphocytaires communs; GMP, progéniteurs de granulocytes et macrophages; CMP, progéniteurs myéloïdes communs; MEP, progéniteurs de mégacaryocytes et érythrocytes; NK, cellules tueuses naturelles; LT-HSC et ST-HSC pour long-term (long terme) et short-term (court terme) (Wang and Wagers 2011)

Chez les patients Fanconi, la capacité de prolifération et de différenciation des cellules souches hématopoïétiques est compromise et conduit à l'apparition de premiers troubles hématologiques vers l'âge médian de sept ans (Alter 2003b; Butturini et al. 1994; Mehta and

Tolar 1993; Shimamura and Alter 2010). Ils prennent le plus souvent la forme d'une cytopénie ou une macrocytose (érythrocytes de grande taille) (Mehta and Tolar 1993). À cinquante ans, les patients ont 70 % de probabilité de développer une défaillance de la moelle osseuse (défaillance médullaire) sévère nécessitant une transplantation (Alter et al. 2016).

La défaillance médullaire correspond à l'incapacité totale pour la moelle osseuse de produire des cellules sanguines suite à la perte progressive des cellules souches hématopoïétiques des patients (Moore and Krishnan 2017). Dans un premier temps, les patients vont présenter une absence ou une diminution de la production d'une lignée de cellules sanguines (cytopénie). Lorsque toutes les lignées sanguines sont atteintes (pancytopénie) et après confirmation de la diminution du nombre de cellules progénitrices dans la moelle osseuse, le diagnostic d'aplasie médullaire est confirmé (Figure 1.3). Lorsque le stade de défaillance médullaire est atteint, la transplantation de moelle osseuse se doit être imminente afin d'éviter la mort du patient.



**Figure 1.3 : Coupe de moelle osseuse de souris.** Condition contrôle (gauche) ou aplasique (droite). Coloration hématoxyline-éosine. En condition d'aplasie, on observe une forte diminution de la densité cellulaire de la moelle (Walter et al. 2015).

Dans le contexte d'instabilité génomique induit par un défaut de réparation de l'ADN, l'évolution clonale maligne des cellules souches hématopoïétiques est fréquente (Bagby and Meyers 2007). Les pathologies hématologiques malignes auxquelles les patients Fanconi sont le plus fréquemment sujets sont le syndrome myélodysplasique et la leucémie myéloïde aigüe (apparition à l'âge médian de 13 et 17 ans respectivement). Ces deux pathologies sont caractérisées par une prolifération anormale des progéniteurs myéloïdes couplée à une altération de leur capacité de différenciation (Gangat, Patnaik, and Tefferi 2016; De Kouchkovsky and Abdul-Hay 2016).

#### 1.1.4.2. Cancers solides

De nombreuses études épidémiologiques mettent en évidence la prédisposition des patients Fanconi aux carcinomes squameux, notamment de la tête et du cou (Alter 2003a; Alter et al. 2016; Kutler et al. 2003; Rosenberg 2005). À 40 ans, le risque de développer un cancer solide chez les patients Fanconi est estimé à 75 % (Alter 2003a). Chez les patients transplantés, ce risque est encore plus accru, car les traitements myéloablatifs utilisés préalablement à la greffe augmentent la carcinogénicité cellulaire en induisant des dommages à l'ADN (Rosenberg 2005).

#### 1.1.4.3. Malformations congénitales

Soixante-quinze pour cent des patients Fanconi présentent des malformations congénitales (Shimamura and Alter 2010). Malgré une grande dissemblance phénotypique, des combinaisons spécifiques de signes cliniques externes sont retrouvées chez les patients. Le système squelettique, la peau et les yeux sont les systèmes les plus souvent affectés tandis que les malformations cardiaques, du système auditif ou du tractus gastro-intestinal sont moins fréquentes (Shimamura and Alter 2010). Les photos de la Figure 1.4 mettent en évidence des malformations observées chez un enfant atteint de l'anémie de Fanconi. On remarque que ce patient présente une microcéphalie, des pouces hypoplasiques et de taches de pigmentation dites « café au lait », des malformations qui sont fréquemment retrouvées chez les patients Fanconi.



**Figure 1.4 : Patient de trois ans présentant des caractéristiques classiques du phénotype Fanconi.** A, Vue de face. B, Visage. C, Mains. D, Dos, épaule droite. On observe notamment la présence d'une microsomie, d'une microcéphalie, de pouces hypoplasiques et de taches « café au lait » (Alter 2003b).

L'ensemble des anomalies physiques congénitales retrouvées chez les patients Fanconi et décrites dans la littérature ont été résumées par Shimamura & Alter, 2010 et sont traduites et adaptées dans le tableau 1.3.

**Tableau 1.3 : Malformations congénitales et fréquences retrouvées chez les patients Fanconi.** Données issues d'une revue de littérature compilant un total de 2002 études de cas et de cohortes de patients Fanconi (Shimamura and Alter 2010).

Caractéristiques physiques des patients Fanconi rapportées dans la littérature	
<i>Microsomie (40 %)</i>	Retard de croissance Petite taille avant/après la naissance, faible poids à la naissance
<i>Pigmentation de la peau anormale (40 %)</i>	Hyperpigmentation généralisée, taches café au lait, hypopigmentation
<i>Malformations squelettiques des membres supérieurs (35 %) Uni ou bilatéral</i>	- Pouces (35 %) : absence, bifide, dupliqué, hypoplasique, plus proximal, long, à trois phalanges - Radius (7 %) : absent ou hypoplasique - Mains (5 %) : absence de la première métacarpe, polydactylie, clinodactylie - Ulna (1 %) : Dysplasique, court
<i>Malformations squelettiques des membres inférieurs (5 %)</i>	Syndactylie, orteils anormaux, pied bot, dislocation de la hanche
<i>Malformations squelettiques - autres</i>	- Tête (20 %) : Microcéphalie, hydrocéphalie - Visage (2 %) : Triangulaire, dysmorphique, hypoplasie médiane, micrognathie - Cou (1 %) : déformation de Sprengel, syndrome de Klippel-Feil, ligne capillaire basse, cou large - Colonne vertébrale (2 %) : spina-bifida, scoliose, hémivertèbre, aplasie coccygienne
<i>Anomalies ophtalmiques (20 %)</i>	Microphthalmie, cataractes, astigmatisme, strabisme, hypotélorisme, hypertélorisme, ptosis, pli épicanthique
<i>Anomalies du tractus urogénital</i>	- Reins (20 %) : en fer à cheval, ectopique, hypoplasique, dysplasique ou absent ; hydronéphrose, hydro-uretère - Gonades (hommes) (25 %) : cryptorchidie, hypospadias, anorchidie, hypo- ou azoospermie, fertilité réduite - Gonades (femmes) (2 %) : utérus mal positionné ou bicorne, petits ovaires
<i>Anomalies du système endocrinien</i>	Hypothyroïdisme, dérégulation glucose/insuline
<i>Anomalies du système auditif (10%)</i>	Perte d'audition, Forme d'oreille anormale : dysplasie, conduit auditif étroit, pavillon anormal (10 %)
<i>Retard de développement (10 %)</i>	Retard mental, retard de développement
<i>Cardiopathies congénitales (6 %)</i>	Canal artériel persistant, communication interauriculaire, communication inter-ventriculaire, coarctation, situs inversus, tronc artériel commun.
<i>Faible poids à la naissance (5 %)</i>	
<i>Anomalies du système gastro-intestinal (5 %)</i>	Atrésie (œsophage, duodénum, jéjunum), Imperforation de l'anus, fistule trachéo-œsophagienne, pancréas annulaire, malrotation intestinale
<i>Anomalies du système nerveux central (3 %)</i>	Petite hypophyse, syndrome d'interruption de la tige hypophysaire, agénésie du corps calleux, hypoplasie cérébelleuse, hydrocéphalie, ventricules dilatés

À ce jour, l'origine de ces malformations demeure idiopathique et peu étudiée malgré le rôle essentiel du tissu osseux en tant que soutien de l'hématopoïèse et la fréquence importante

des malformations du système squelettique observées chez les patients (Boulais and Frenette 2015). Ce système sera détaillé dans la section 1.3.4 de ce chapitre.

### **1.1.5. Traitements**

Soigner les patients Fanconi est une réelle problématique (Ebens, MacMillan, and Wagner 2017; MacMillan and Wagner 2010). En l'absence de donneur compatible pour une transplantation de moelle osseuse, des traitements alternatifs vont être proposés aux patients. La prise d'androgènes va permettre d'augmenter la production d'érythrocytes (Bachman et al. 2014). Les facteurs stimulants de colonies de granulocytes (G-CSF) vont eux, permettre d'augmenter la production de neutrophiles (Semerad et al. 2002). Cependant, ces traitements sont dommageables sur le long terme, notamment chez les jeunes patients. En effet, la prise d'androgènes virilise les patients, ralentit leur croissance en accélérant la maturation des cartilages de conjugaison et induit une forte toxicité hépatique tandis que les facteurs stimulants de colonies de granulocytes vont appauvrir le réservoir de cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse en favorisant leur migration vers le sang (Greenbaum and Link 2011).

La greffe de moelle osseuse reste donc le traitement privilégié. Cependant, elle provoque des effets secondaires très nocifs pour les patients Fanconi (Alter 2017). En effet, malgré l'amélioration constante des protocoles de transplantation, les cellules des patients demeurent extrêmement sensibles aux agents myéloablatifs et aux radiations préalables à la greffe (Ebens et al. 2017; Gluckman 2015) qui vont augmenter leur carcinogénicité et la formation de carcinomes chez les receveurs (Rosenberg 2005). De plus, les glucocorticoïdes utilisés pour diminuer l'inflammation pendant ou à la suite de la greffe (Coutinho and Chapman 2011) induisent une ostéoporose précoce (Komori 2016; Shankar et al. 2017). Enfin, la transplantation semble devoir être réalisée préférentiellement chez des patients en bas âge pour permettre une réelle amélioration de la survie post-transplantation (Bierings et al. 2018; MacMillan and Wagner 2010; Peffault de Latour et al. 2013; Smetsers et al. 2016).

Afin d'éviter les complications relatives à la greffe de moelle osseuse, d'autres stratégies thérapeutiques sont en cours d'étude. Plusieurs d'entre elles reposent sur la thérapie génique et la correction de la mutation dans les cellules souches hématopoïétiques des patients, notamment via des vecteurs lentiviraux (Diez et al. 2017; Zhang 2017). Toutefois, ces approches thérapeutiques risquent d'être limitées par le faible nombre de cellules hématopoïétiques présentes initialement chez les patients (Ceccaldi, Sarangi, and D'Andrea 2016). Une autre

stratégie serait de greffer les patients très tôt, en bas âge, avant l'apparition des premiers troubles hématologiques, limitant ainsi les risques de développer des hémopathies par la suite (Khan et al. 2016). Pour que les patients Fanconi puissent bénéficier de ce traitement préventif, il serait nécessaire qu'ils soient diagnostiqués en bas âge, avant l'apparition des troubles hématologiques. Ce qui est rarement le cas à l'heure actuelle (Fanconi Anemia Research Fund 2014). De plus, ce traitement ne ciblerait que les troubles hématologiques.

Aujourd'hui encore, de nombreuses zones d'ombres entourent cette pathologie. D'un point de vue clinique, le système hématopoïétique et les cancers solides sont au cœur de l'anémie de Fanconi. Toutefois, les patients sont également atteints de nombreuses malformations congénitales et celles affectant le tissu osseux peuvent aggraver les altérations du système hématopoïétique (Auerbach 2009; Fanconi Anemia Research Fund 2014; Szade et al. 2017). D'un point de vue fondamental, de nombreuses études mettent en évidence l'implication des protéines Fanconi en dehors de la voie de signalisation Fanconi/BRCA et de la réparation de l'ADN (Sumpter and Levine 2017). C'est le cas notamment de la protéine FANCC, qui est principalement localisée dans le cytoplasme malgré son rôle dans la réparation de l'ADN (Youssoufian 1994).

Avant mon arrivée dans l'équipe de recherche du Dre Carreau, le laboratoire a réalisé un criblage en double hybride chez la levure qui a permis d'étudier l'interactome de la protéine FANCC et d'identifier de nouveaux rôles potentiels pour la protéine FANCC, notamment dans la régulation de l'expression du gène *Dkk1* (Dickkopf-related protein 1) (Huard et al. 2013). Suite à cette étude, le laboratoire du Dre Carreau a également mis en évidence l'élévation de la concentration plasmatique de la protéine DKK1 dans des modèles murins déplétés en protéines FANCA et FANCC (Huard et al. 2014). Cette protéine est impliquée dans la régulation de l'hématopoïèse, mais également la formation et l'homéostasie du tissu squelettique (Fleming et al. 2008; McDonald et al. 2017).

## 1.2. DKK1

La protéine DKK1 est un inhibiteur de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine (Niehrs 2006). Sa liaison avec son récepteur Kremen et le co-récepteur de Wnt, LRP5/6 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6), entraîne l'internalisation du complexe ternaire.

L'activation de la voie de signalisation est alors limitée par la diminution de la disponibilité de LRP5/6 à la membrane plasmique (Niehrs 2006). De nombreuses activités cellulaires telles que la prolifération et la différenciation sont régulées par la voie de Wnt, et donc la protéine DKK1 permet de moduler son activation (Logan and Nusse 2004; Willert et al. 2003). Le chapitre 2 rend compte du mode d'action, de la structure et de la fonction de la protéine DKK1 dans le développement embryonnaire, mais aussi dans la détection et la progression des cancers, notamment ostéolytiques à travers une revue de littérature publiée par notre laboratoire.

On observe chez les patients Fanconi de nombreuses malformations squelettiques (Shimamura and Alter 2010). De plus, les patients Fanconi et les souris déplétées en protéines Fanconi présentent une élévation de la concentration plasmatique de Dkk1 (Huard et al. 2014). Etant donné le rôle de la protéine Dkk1 dans la formation et l'homéostasie du système squelettique, l'élévation de la concentration plasmatique de Dkk1 chez les souris Fanconi pourrait refléter une pathologie osseuse sous-jacente jusque-là non suspectée chez les patients en raison de la concentration de l'attention médicale sur les cellules souches hématopoïétiques et les cancers. Dans ce contexte, une étude approfondie du tissu osseux dans le cadre de l'anémie de Fanconi semble donc indispensable.

### **1.3. Le tissu osseux**

Le système squelettique est un outil multifonctionnel. Il façonne la charpente du corps, supporte son poids et agit en tant que levier afin de permettre le mouvement suite aux contractions musculaires (DiGirolamo, Kiel, and Esser 2013). Il offre également une protection pour les organes internes, permet de stocker des minéraux tels que le calcium et abrite la moelle osseuse hématopoïétique (Karner and Long 2017; Robling, Castillo, and Turner 2006). Chez l'adulte, il est composé de deux types tissulaires différents et symbiotiques : le tissu osseux et le tissu cartilagineux. Durant ces travaux de recherche, mon intérêt s'est porté plus spécifiquement sur le tissu osseux en raison de son rôle de soutien de l'os dans l'hématopoïèse, de la fréquence importante des malformations squelettiques retrouvées chez les patients et de la surexpression de Dkk1 dans le plasma des souris Fanconi (Calvi et al. 2003; Fajardo-Orduña, Mayani, and Montesinos 2015; Huard et al. 2014; Taichman 2005).

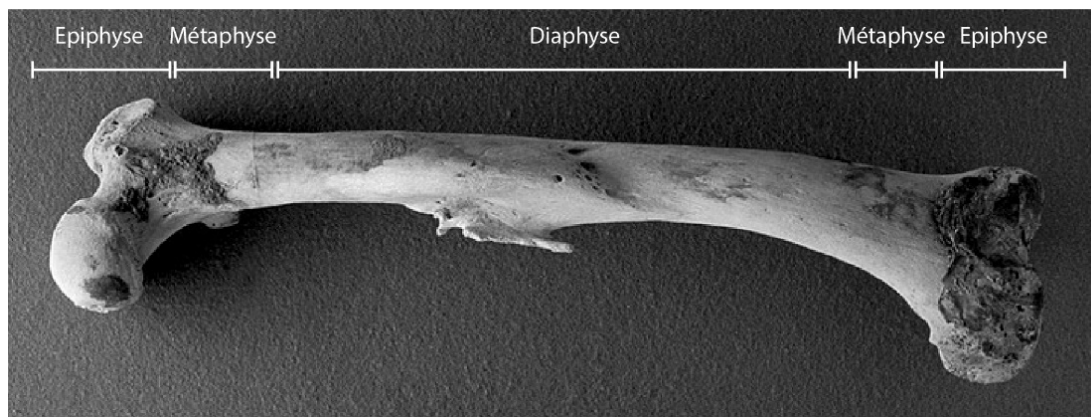


### 1.3.1. Structure

#### 1.3.1.1. Macrostructure

Chez l'adulte, plus de deux cents os composent le corps humain. Ils sont répartis selon leur morphologie en quatre classes : les os plats (ex : os du crâne, sternum, côtes), les os courts (ex : carpes, tarses, patella), les os longs (radius, fémurs, phalanges) et ceux n'ayant aucune des trois formes précédentes, les os irréguliers (ex : sacrum, coccyx, vertèbres) (Buckwalter et al. 1996; Safadi et al. 2009). Étant donné qu'ils supportent la majeure partie du poids du corps, les os longs des membres inférieurs sont souvent les premiers à manifester des signes de fragilité osseuse lors d'altérations du système squelettique. J'ai donc choisi d'étudier plus particulièrement ce type d'os au cours de mon doctorat.

Les os longs sont composés de trois zones distinctes : la diaphyse (partie centrale de l'os, de forme cylindrique), l'épiphyse (partie articulaire située à chaque extrémité de l'os, de forme arrondie) et la métaphyse (partie située entre l'épiphyse et la diaphyse, de forme conique) (Figure 1.5) (Buckwalter et al. 1996; Eriksen, Axelrod, and Melsen 1994).



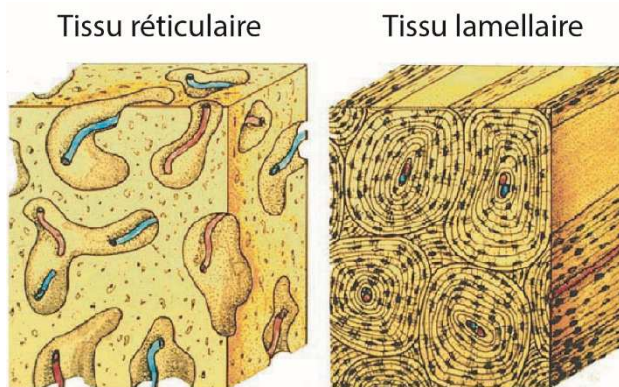
**Figure 1.5 : Structure générale d'un humérus humain.** L'humérus est un os long composé de trois parties distinctes : la diaphyse, au centre, les épiphyses, aux extrémités distales et proximales et les métaphyses, zone intermédiaire entre la diaphyse et l'épiphyse. Image issue de la banque d'image : Wellcome images. Crédit : Tell Fara (cc by 4.0).

La diaphyse est principalement composée d'os cortical et contient la moelle osseuse dite jaune, en raison de la prédominance des cellules adipeuses en son sein. Les épiphyses, en revanche, sont majoritairement composées d'os trabéculaire (ou spongieux) et abritent la moelle osseuse dite rouge ou hématopoïétique. La métaphyse quant à elle contient la plaque de

croissance qui deviendra la ligne épiphysaire une fois la croissance terminée (Buckwalter et al. 1996; Eriksen et al. 1994). Chaque partie de l'os possède une fonction distincte qui s'explique par une organisation micro- et ultrastructurale particulière.

#### 1.3.1.2. Microstructure

D'un point de vue histologique, il existe deux types de tissu osseux : le tissu osseux réticulaire ou lamellaire. Ils se distinguent au niveau microstructural par leur mode de formation, d'organisation, leur degré de maturation et leurs propriétés mécaniques qui diffèrent grandement (Figure 1.6) (Buckwalter et al. 1996).



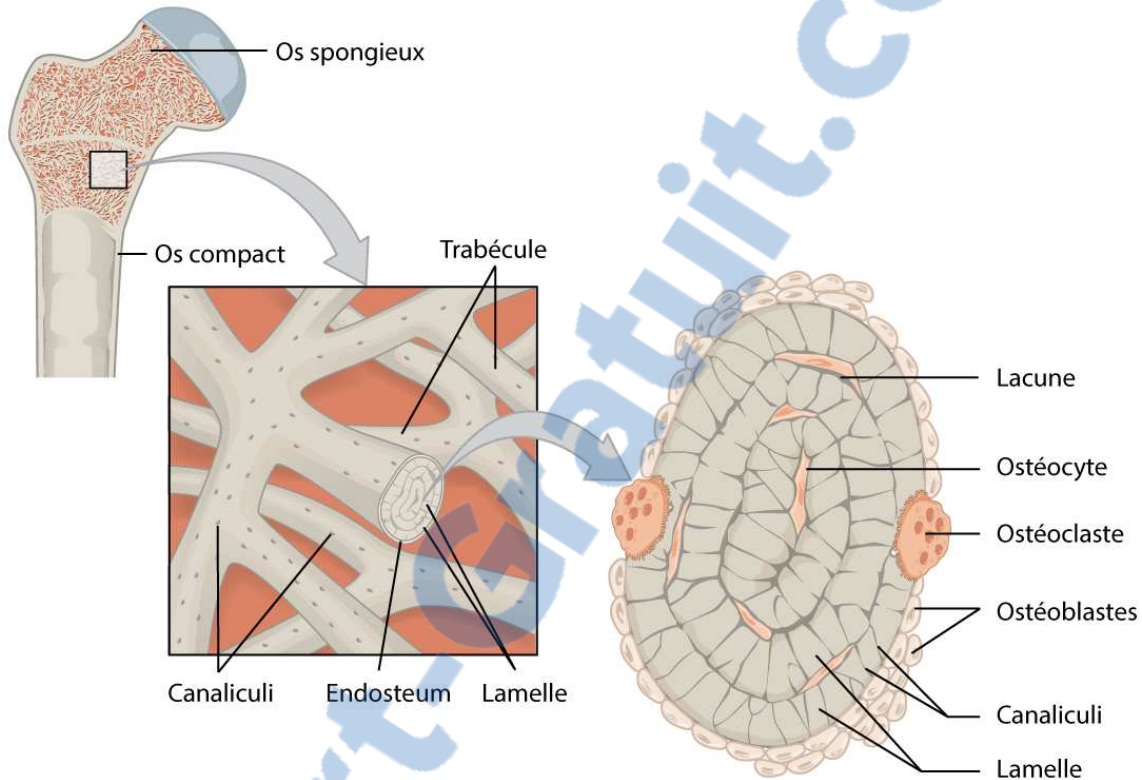
**Figure 1.6 : Représentation schématique de la structure du tissu réticulaire.**

Le tissu réticulaire (schéma de gauche) est composé de fibres de collagène et de vaisseaux non-orientés. L'organisation du tissu lamellaire (schéma de droite) est, elle, structurée en lamelles de collagène concentriques (Safadi et al. 2009).

Le tissu osseux réticulaire est composé de fibres de collagène dont l'orientation n'est pas organisée (Figure 1.6). Il est très peu calcifié, ce qui lui confère une grande flexibilité mais une faible résistance mécanique (Torzilli et al. 1982). Chez l'adulte, ce tissu est très peu présent. On le retrouve dans certaines régions spécifiques (racine des dents ou os mandibulaire) ou lors du processus de remodelage osseux faisant suite à une fracture (Buckwalter et al. 1996). C'est en revanche le tissu osseux principal de l'embryon. Au cours du développement, il sera résorbé et remplacé par du tissu lamellaire (Buckwalter et al. 1996).

Il existe plusieurs types de tissus lamellaires. Ils se distinguent du tissu osseux réticulaire par l'organisation de leurs fibres de collagène. Nous nous attarderons plus particulièrement sur l'ostéon, qui est la structure principale de l'os cortical, et la forme trabéculaire, qui est la structure principale de l'os trabéculaire (Buckwalter et al. 1996; Safadi et al. 2009). Les différences dans la distribution et l'arrangement de ces tissus sont responsables de leurs différentes propriétés mécaniques (Currey 1990; Goldstein 1987; Oftadeh et al. 2015).

Dans les os longs, le tissu osseux trabéculaire est principalement localisé dans des épiphyses où il est en contact étroit avec la moelle osseuse. Sa porosité est de 50 à 90 % (Renders et al. 2007). Il est composé d'os lamellaire organisé en forme semi-circulaire ou héli-ostéon (Figure 1.7) (Buckwalter et al. 1996; Eriksen et al. 1994).

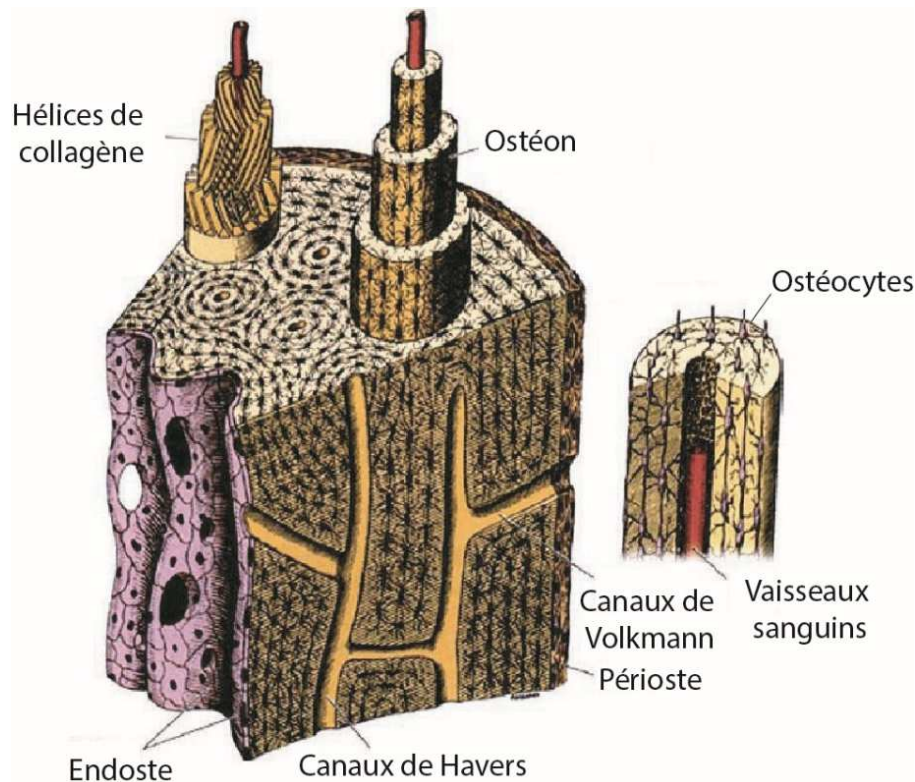


**Figure 1.7 : Représentation schématique de la structure du tissu osseux trabéculaire.** L'os spongieux ou trabéculaire est situé dans les épiphyses. Il est composé de trabécules elles-mêmes composées de fibres de collagène orientées de manière concentrique. Entre les lamelles se situent les ostéocytes. Ces derniers sont reliés entre eux par des canaliculi. La porosité de l'os trabéculaire le rend plus accessible au remodelage osseux par les ostéoclastes. Image issue du site open source : oerpub.

L'os trabéculaire est moins résistant que l'os cortical, mais son activité métabolique est supérieure (Bayraktar et al. 2004; Clarke 2008). Il est fréquemment remodelé et répond plus rapidement aux stimulations en raison de sa proximité avec les vaisseaux sanguins et facteurs circulants (facteurs de croissance et cytokines) (Buckwalter et al. 1996). Il permet également à l'os de s'adapter à la pression en absorbant les charges et en facilitant sa déformation (Currey 1979; Goldstein 1987). Ce tissu joue un rôle très important dans l'hématopoïèse car il est en contact étroit avec les cellules souches hématopoïétiques dont l'activité cellulaire est influencée

par les facteurs circulants produits par les cellules osseuses ou la dégradation de la matrice osseuse (Calvi et al. 2003; Calvi and Link 2014; Fleming et al. 2008).

L'os cortical représente 80 % du tissu osseux des os longs (Eriksen et al. 1994). Il est parfois nommé os compact en raison de sa très faible porosité (moins de 5 %) (Renders et al. 2007). Sa surface interne (côté médullaire) est bordée par l'endoste. Sa surface externe est bordée par le périoste. Ces deux types de tissu conjonctif sont associés étroitement avec l'os cortical et participent à son remodelage osseux et à sa vascularisation (Figure 1.8) (Safadi et al. 2009). Dans l'os cortical, les hélices (ou fibres) de collagène ont une organisation spatiale très spécifique qui va définir la force de l'os (Martin and Ishida 1989). Ces fibres de collagène orientées sont organisées en lamelles. Entre les lamelles sont logées des cellules spécialisées, les ostéocytes. Les lamelles osseuses forment des ensembles circulaires nommés ostéons ou système de Havers (Figure 1.8) (Safadi et al. 2009).



**Figure 1.8 : Représentation schématique de la structure de l'os cortical.**

L'os cortical est bordé par l'endoste du côté médullaire (où se trouve la moelle osseuse) et par le périoste du côté externe. Son unité structurelle est l'ostéon, qui parcourt l'os cortical dans le sens de la longueur. L'ostéon est composé de couches concentriques de collagène ayant chacune une

orientation particulière. Entre les lamelles de collagène sont situés les ostéocytes dont l'apport de nutriments est assuré par les vaisseaux sanguins circulants au sein de l'ostéon dans les canaux de Havers et de Wolkman. La communication entre la moelle et le périoste est assurée par des canaux qui traversent l'os cortical transversalement, les canaux de Wolkman. Adapté de Safadi et al. 2009.

L'os cortical possède une activité métabolique inférieure à celle de l'os trabéculaire (Clarke 2008). Il confère à l'os sa résistance et sa solidité grâce à une organisation ultrastructurale très spécifique.

### 1.3.1.3. Ultrastructure

Au niveau ultrastructural, l'os est composé de deux parties : une matrice osseuse et des cellules osseuses. La matrice osseuse représente 90 % du tissu osseux (Eriksen et al. 1994). Elle contient une partie inorganique composée de minéraux et une partie organique riche en protéines (Glimcher 1987).

La phase inorganique confère au tissu osseux sa rigidité (Datta et al. 2008). Elle est principalement constituée de cristaux d'hydroxyapatite (phosphate tricalcique) et de carbonate de calcium localisés entre les fibres de collagène (Landis 1995). Elle constitue un réservoir minéral pour le corps et permet de maintenir une concentration extracellulaire en minéraux optimale pour la réalisation des fonctions physiologiques.

La partie organique est responsable de la forme et de la flexibilité de l'os (Viguet-Carrin, Garnero, and Delmas 2006). On y retrouve majoritairement du collagène de type I et en plus faible quantité, des protéoglycanes, glycoprotéines et facteurs de croissance (tels que des interleukines, les protéines ostéocalcine, ostéonectine et des BMP (Bone Morphogenic Proteins) : des cytokines de la superfamille Transforming Growth Factor beta (Brodsky and Persikov 2005). Malgré leur faible concentration, ces protéines jouent un rôle très important dans la régulation de la minéralisation de la matrice et dans la prolifération des cellules du tissu osseux (Aszódi et al. 2000; Buckwalter et al. 1996; Gundberg 2003).

Le déséquilibre entre la proportion des phases organique et inorganique peut conduire à des pathologies très sévères telles que l'*osteogenesis imperfecta* de type I, qui se caractérise par une

diminution de la production de collagène de type I et conduit à un phénotype de fragilité osseuse extrême appelé communément « maladie des os de verre » (Van Dijk et al. 2011).

Au sein du tissu osseux, la production de partie organique de la matrice osseuse est orchestrée par un seul type de cellule osseuse : les ostéoblastes (Buckwalter et al. 1996; Long 2011). Mais ce n'est pas l'unique type cellulaire qui compose le tissu osseux.

### **1.3.2. Composition cellulaire du tissu osseux**

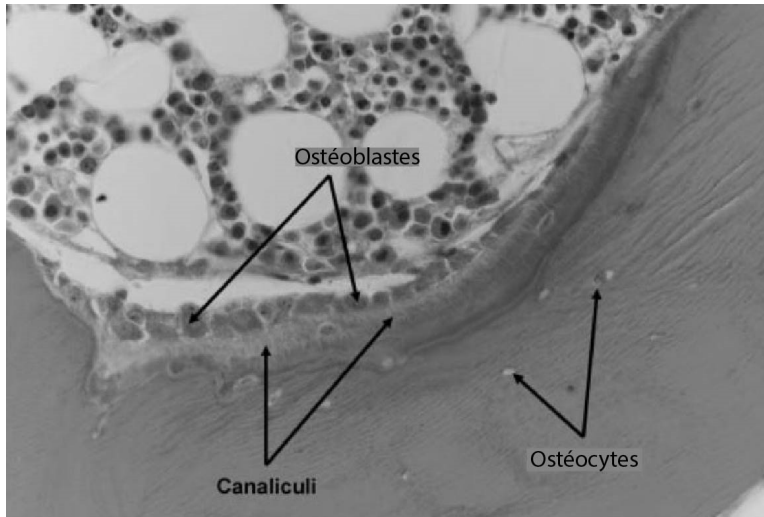
#### **1.3.2.1. Les cellules osseuses**

Le tissu osseux est composé de quatre différents types de cellules osseuses : les cellules bordantes, les ostéoblastes et les ostéocytes, qui sont les cellules ostéoformatrices, et les ostéoclastes, qui sont les cellules responsables de la dégradation du tissu osseux (Buckwalter et al. 1996; Downey and Siegel 2006).

*Les cellules bordantes* sont des cellules quiescentes situées le long de l'os « inactif » (non modelé ou remodelé) (Miller et al. 1989). Elles restent dans un stade indifférencié jusqu'à ce qu'elles soient activées par des signaux extracellulaires qui vont induire leur migration et leur prolifération (Everts et al. 2002).

*Les ostéoblastes* sont des cellules de forme cubique. On les retrouve à la surface externe et interne du tissu osseux (Figure 1.9) (Buckwalter et al. 1996; Eriksen et al. 1994). Ils synthétisent et sécrètent une matrice osseuse organique non minéralisée appelée ostéoïde (Capulli, Paone, and Rucci 2014; Clarke 2008). Une fois différenciés, les ostéoblastes matures peuvent devenir soit des ostéocytes, soit des cellules bordantes, soit entrer en apoptose et mourir (Jilka et al. 1998).

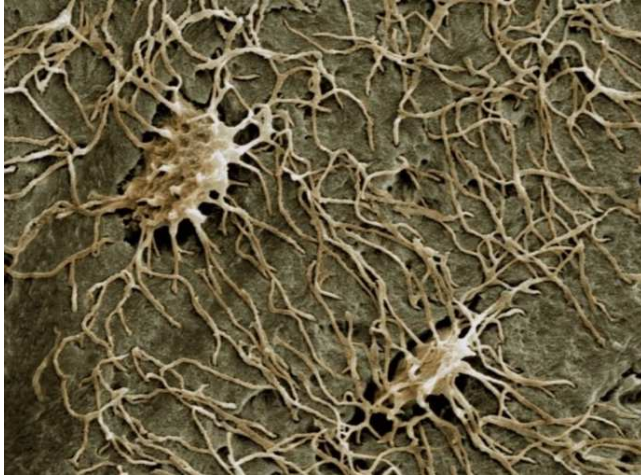




**Figure 1.9 : Ostéoblastes.** Les ostéoblastes synthétisent une nouvelle matrice osseuse non minéralisée (ostéoïde) sur l'os préexistant. Certains ostéoblastes se retrouvent piégés dans la matrice osseuse qui se minéralise et deviennent des ostéocytes. D'un point de vue structural, les ostéoblastes sont l'interface entre la moelle osseuse et l'os minéralisé. Adapté de Clarke 2008.

Le niveau de maturation des ostéoblastes peut être évalué grâce à leur expression génique. L'expression du gène *Runx2* (*Runx-related transcription factor 2*) dans les ostéoblastes immatures induit l'expression de gènes spécifiques des progéniteurs ostéoblastiques tels que *Col1a1* (*Collagen alpha-1[I] chain*), *Alp* (*Alkaline phosphatase*), and *Opn* (*Osteopontin*) (Fakhry 2013; Murshed et al. 2005). Suite à l'expression de ces gènes, les cellules progénitrices prolifèrent et l'activité de la phosphatase alcaline augmente dans ces cellules (Capulli et al. 2014). Enfin, l'expression du gène *Sp7* (ou *Osterix*) et la sécrétion de protéines de la matrice osseuse telles que OSTEOCALCIN (OCN) et COL1A1 marquent leur différenciation terminale en ostéoblastes (Ducy 2000; Glass et al. 2005; Nakashima et al. 2002). En plus de leur rôle dans la formation du tissu osseux, les ostéoblastes sont également impliqués dans la régulation de l'hématopoïèse (Asada and Katayama 2014; Asada, Takeishi, and Frenette 2017; Galán-Díez and Kousteni 2017; Ho et al. 2015). Il a notamment été démontré que la surexpression de DKK1 par ces cellules entraîne l'augmentation de l'activité mitotique des CSH et la diminution de leur capacité régénératrice après transplantation (Fleming et al. 2008).

*Les ostéocytes* représentent 90 % des cellules osseuses (Buckwalter et al. 1996; Franz-Odenaal, Hall, and Witten 2006). Ce sont des ostéoblastes différenciés, entourés de matrice calcifiée et vivant dans des vacuoles, appelées lacunes, au sein même du tissu osseux (Figure 1.10).



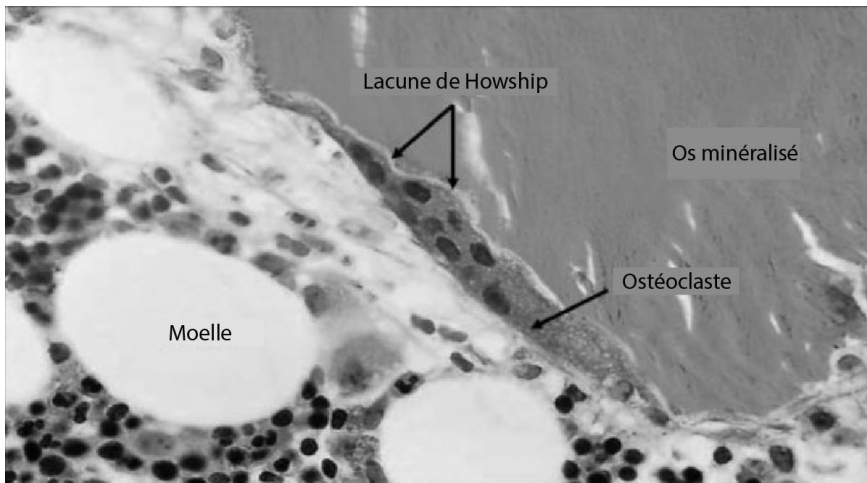
**Figure 1.10 : Ostéocytes piégés dans leur lacune au sein de l'os minéralisé.** Les deux ostéocytes présentent de nombreux prolongements cytoplasmiques, les canaliculi, qui permettent la communication entre eux et avec les ostéocytes adjacents. Image issue de la banque d'image : Wellcome images. Crédit : Kevin McKenzie (cc by-nc-nd 2.0)

Ces cellules ont de nombreuses fonctions au sein du tissu osseux (Bonewald 2011). Elles entretiennent la matrice osseuse et régulent l'homéostasie calcique. Elles agissent également à titre de mécanosenseurs des modifications physiques subites par l'os (Bonewald 2011; Rubin and Lanyon 1987). Elles transforment des signaux de stress de pliure ou d'extension en activité biologique (Knothe Tate 2003) selon un processus encore méconnu. Cette caractéristique permet l'adaptation de l'os aux tensions mécaniques qu'il reçoit quotidiennement (Rochefort, Pallu, and Benhamou 2010) en orchestrant le remodelage osseux via les ostéoblastes et les ostéoclastes (Bonewald 2007).

Une fois les ostéoblastes devenus ostéocytes l'expression des marqueurs ostéoblastiques OCN, COL1a1 et ALP est réprimée et l'expression de gènes spécifiques des ostéocytes, tel que SCLEROSTINE (SOST), augmente (Bonewald 2011; Poole 2005).

*Les ostéoclastes* sont de larges cellules multinucléées. Elles se fixent à la matrice osseuse minéralisée et la solubilisent en sécrétant des ions hydrogènes et des enzymes telles que la cathepsine K (Figure 1.11). Les ions vont acidifier le milieu et permettre la dissolution des minéraux tandis que la cathepsine K va dégrader le collagène (Boyle, Simonet, and Lacey 2003; Buckwalter et al. 1996; Saltel et al. 2004; Silver, Murrills, and Etherington 1988).





**Figure 1.11 :**  
**Ostéoclaste multinucléé digérant de l'os minéralisé.**

Les ions et les enzymes sont sécrétés par les ostéoclastes à la surface de l'os minéralisé dans une lacune appelée lacune de Howship. Adapté de Clarke 2008.

Les ostéoclastes ont donc une fonction de résorption osseuse (dégradation de l'os). L'augmentation de leur activité permet d'augmenter le niveau circulant de calcium sur le court terme, mais induit sur le long terme une diminution de la densité minérale osseuse et augmente les risques de fracture ainsi que l'émergence de maladies osseuses telles que l'ostéoporose (Feng and McDonald 2011).

Les ostéoclastes expriment et sécrètent de manière spécifique les enzymes TRAP (Tartrate-resistant acid phosphatase type 5) et cathepsine K qui sont indispensables à leur activité (Matsumoto et al. 2004).

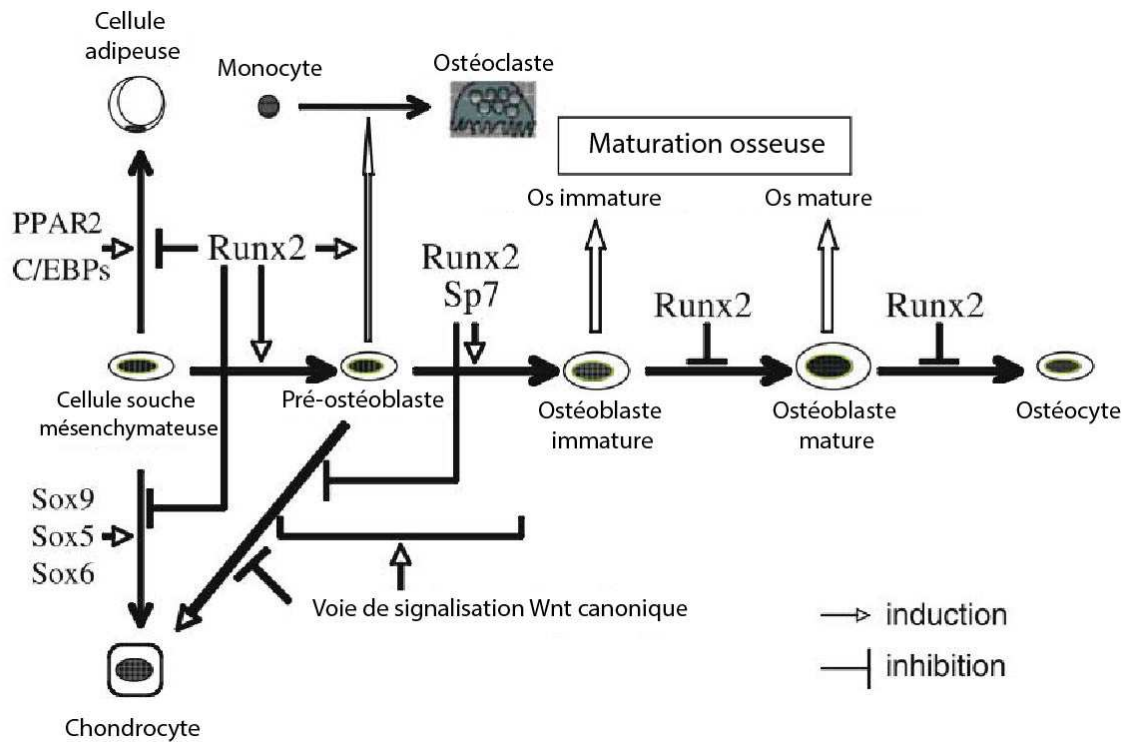
L'ensemble des cellules de l'os proviennent de la différenciation de cellules souches d'origine soit mésenchymateuse, soit hématopoïétique.

#### 1.3.2.2. Les cellules souches du tissu osseux et leur régulation

Ces cellules du tissu osseux proviennent de deux lignées cellulaires différentes. Les cellules bordantes, les ostéoblastes et les ostéocytes sont issus de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses. Les ostéoclastes eux, proviennent de la lignée hématopoïétique myéloïde (Buckwalter et al. 1996; Clarke 2008). Ces cellules souches ne résident pas dans le tissu osseux, mais sont retrouvées dans la moelle osseuse et constituent un réservoir de cellules progénitrices mobilisables.

#### *Les cellules souches mésenchymateuses*

Chez l'adulte, on retrouve les cellules souches mésenchymateuses dans la plupart des tissus (Doherty et al. 1998) et notamment au sein de la moelle osseuse où elles vivent en étroite relation avec d'autres types cellulaires, dont les cellules souches hématopoïétiques (Taichman 2005). La nature exacte de leur immunophénotype étant toujours largement débattue dans la littérature (Bara et al. 2014), d'autres caractéristiques propres à ce type cellulaire sont utilisées afin de les étudier *in vitro* et *ex vivo* : leur capacité d'adhérence à un support de culture et leur morphologie fibroblastique. Cependant, c'est grâce à leur potentiel de différenciation qu'elles sont principalement caractérisées. En effet, les cellules souches mésenchymateuses sont des cellules souches multipotentes qui peuvent se différencier en de nombreux types cellulaires, dont les adipocytes, les chondroblastes et les ostéoblastes (Friedenstein, Chailakhjan, and Lalykina 1970; Pittenger 1999). L'engagement des cellules souches mésenchymateuses dans une lignée spécifique est déterminé par le niveau d'expression de nombreux facteurs de transcription (Figure 1.12). Dans le cas de la différenciation ostéoblastique et ostéocytaire, le facteur de transcription RUNX2 agit en tant que « master switch » (Komori 2009).



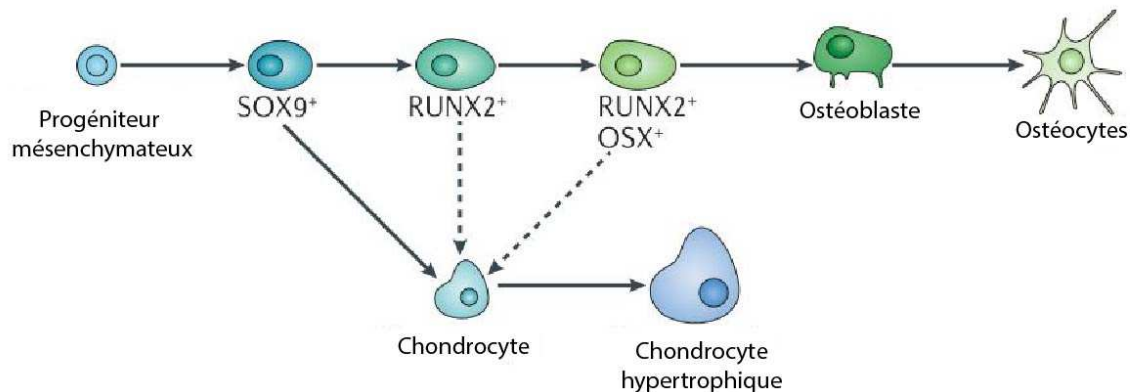
**Figure 1.12 : Régulation de la différenciation mésenchymateuse par Runx2 et la voie de signalisation Wnt.** Les cellules souches mésenchymateuses peuvent se différencier en adipocytes, chondrocytes et ostéocytes. Leur différenciation en ostéocytes passe par de nombreux stades de maturation qui sont contrôlés principalement par la voie de signalisation Wnt, qui favorise la différenciation ostéoblastique et inhibe la différenciation chondrocytaire, et l'expression du gène *Runx2*, qui inhibe la différenciation adipocytaire dans les premiers stades de maturation et inhibe la différenciation terminale des ostéoblastes et ostéocytes dans les derniers stades de maturation. Adapté de Komori 2009.

L'engagement puis la différenciation des cellules souches mésenchymateuses dans la lignée ostéoblastique/ostéocytaire nécessitent une modulation fine de l'expression du gène *Runx2* (Komori et al. 1997). En effet, afin de permettre la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en ostéoblastes, le facteur de transcription *Runx2* doit être exprimé dans les cellules progénitrices (Ducy and Zhang 1997; Komori et al. 1997), induire l'expression du facteur de transcription *Sp7* (Capulli et al. 2014; Nakashima et al. 2002) puis être réprimé dans les derniers stades de différenciation (Bruderer et al. 2014; Komori 2009). Cette inhibition permet la différenciation terminale des ostéoblastes et leur transformation en ostéocytes (Figure 1.12) (Augello and De Bari 2010).

Mais l'engagement des cellules souches dans la lignée ostéoblastique/ostéocytaire dépend également du niveau d'expression des gènes impliqués dans la différenciation

adipocytaire tels que *Pparg* (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) et *Twist* (*Twist Family basic helix-loop-helix transcription factor 1*). En effet, au début de la différenciation adipocytaire, l'expression des gènes *C/ebpa* (*CCAAT/enhancer-binding protein alpha*) et *Pparγ* augmente dans les cellules progénitrices (Tontonoz, Hu, and Spiegelman 1995; Yeh et al. 1995). Puis, suite à l'expression des facteurs de transcription *Pparg* et *Twist*, l'adipogenèse est favorisée et l'ostéogenèse inhibée (Isenmann et al. 2009; Marie and Kaabeche 2006; Nuttall 2004).

On retrouve également une compétition entre la différenciation ostéoblastique et chondrocytaire qui est régulée par le facteur de transcription *Runx2*. Comme expliqué plus haut, les ostéoblastes et chondrocytes sont issus des mêmes progéniteurs. Ces derniers vont initialement exprimer le gène *Sox9* (*SRY [sex determining region Y]-box 9*) qui est le gène régulateur de la différenciation chondrocytaire (Akiyama et al. 2002). Cependant, si l'expression du gène *Runx2* est ensuite induite dans ces cellules, elles vont s'engager dans la lignée ostéoblastique. L'inhibition de la voie de signalisation Wnt dans les premiers stades de la différenciation chondrocytaire permet de prévenir cette possibilité en inhibant l'expression de *Runx2* (Figure 1.13) (Augello and De Bari 2010; Day et al. 2005).



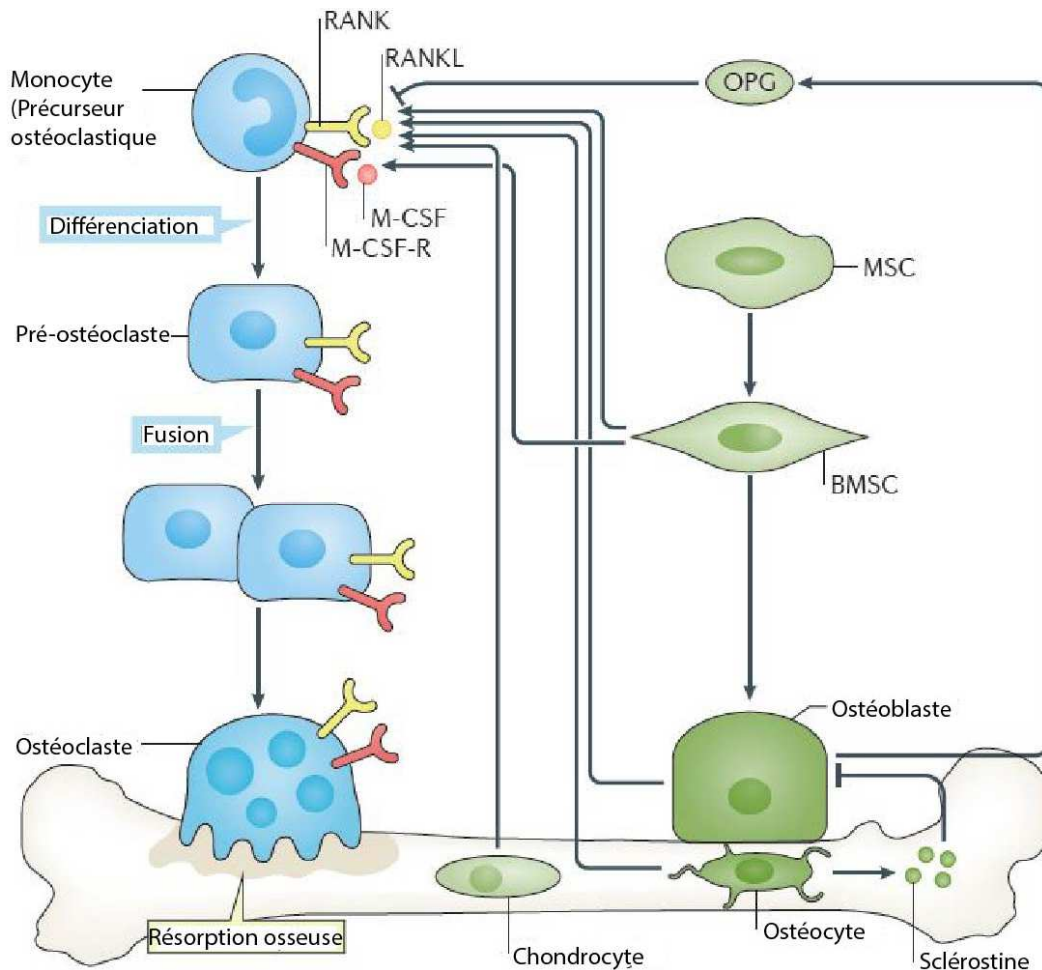
**Figure 1.13 : Régulation génique de l'engagement des cellules souches mésenchymateuses vers la lignée ostéoblastique ou chondrocytaire.** L'expression du facteur de transcription *Sox9* induit l'engagement des cellules souches mésenchymateuses dans la lignée ostéoblastique ou ostéocytaire. En l'absence d'expression du facteur de transcription *Runx2*, les cellules progénitrices vont se différencier en chondrocytes. Ces derniers achèveront leur différenciation en devenant hypertrophiques. Cependant, la surexpression de *Runx2* dans les cellules progénitrices va orienter leur différenciation vers la lignée ostéoblastique. Suite à la différenciation en ostéoblastes, les cellules sont définitivement engagées dans la lignée ostéoblastique/ostéocytaire (Long 2011).

Alors que la différenciation des cellules ostéoformatrices à partir des CSM (cellules souches mésenchymateuses) est régulée par de nombreux facteurs de transcription, la différenciation des

ostéoclastes à partir des cellules souches hématopoïétiques nécessite un nombre très restreint de molécules.

#### *Les cellules souches hématopoïétiques*

Leur différenciation permet la production des ostéoclastes. Ces derniers sont des cellules multinucléées issues de la fusion de progéniteurs mononucléaires de la lignée myéloïde monocyttaire (Boyle et al. 2003; Burger, van der Meer, and Nijweide 1984). Deux molécules sont nécessaires et suffisantes pour promouvoir leur formation : le M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor) et le ligand RANKL (Receptor for Activation of Nuclear factor Kappa B [NF-KB] [RANK] Ligand) (Lacey et al. 1998; Udagawa et al. 1990). Ces molécules sont produites par les ostéoblastes et les cellules stromales (Takahashi et al. 1988; Udagawa et al. 1990). Le M-CSF se lie aux précurseurs des ostéoclastes et promeut leur prolifération. RANKL se fixe aux récepteurs RANK (Receptor for Activation of Nuclear factor Kappa B [NF-KB]) présents sur la membrane des précurseurs ostéoclastiques et favorise leur différenciation terminale (Figure 1.14) (Teitelbaum 2000).



**Figure 1.14 : Régulation moléculaire de la différenciation ostéoclastique.** La différenciation des monocytes en ostéoclastes est initiée à la suite de l'activation des monocytes par les protéines RANKL et M-CSF (Facteur stimulant de colonies de macrophages). La source de RANKL provient des cellules stromales de la moelle osseuse (BMSC), des ostéoblastes, ostéocytes et chondrocytes. Les ostéocytes sont également la source de production du M-CSF. L'activation des monocytes induit leur différenciation en préostéoclastes puis leur fusion et conduit ultimement à la formation des ostéoclastes matures, capables de résorber la matrice osseuse minéralisée. La régulation négative de la différenciation des ostéoclastes s'effectue via la production d'ostéoprogérine (OPG) par les ostéoblastes, qui peut toutefois être inhibée par la production de SOST par les ostéocytes (Weitzmann and Oforokun 2016).

Le tissu osseux est donc composé de différents types cellulaires qui participent à sa formation et sa dégradation, qui sont issus de deux types différents de cellules souches et qui sont régulés par de nombreuses protéines et voies de signalisation. Ensemble, ces cellules

coopèrent pour permettre le développement et le maintien de la forme, la force et la fonction du tissu osseux tout au long de la vie.

### 1.3.3. Développement

La formation de tissu osseux porte le nom d'ostéogenèse. Elle commence au stade embryonnaire et s'arrête à la fin de la vie. Les ostéoblastes synthétisent le tissu osseux (ostéogenèse) qui est ensuite façonné par les ostéoclastes (modeling) et sera remanié tout au long de la vie pour répondre à la demande de la croissance osseuse et des modifications du milieu (remodeling) (Clarke 2008).

#### 1.3.3.1. Ostéogenèse

Elle est réalisée à partir des cellules souches mésenchymateuses qui vont migrer depuis le mésoderme et les crêtes neurales jusqu'aux sites de formation de l'os. Puis, en fonction de la nature de l'os, deux types d'ossifications différentes vont se produire chez l'embryon : l'ossification intramembranaire ou endochondrale (Berendsen and Olsen 2015).

##### *L'ossification intramembranaire*

C'est une formation osseuse spontanée, réalisée sans support cartilagineux. Elle est à l'origine de la formation des os plats, des os de la face, du crâne et des clavicules (Buckwalter et al. 1996). Au cours de l'ossification intramembranaire, les cellules souches mésenchymateuses prolifèrent et se condensent au site des futurs os (Hall and Miyake 1992). Un centre d'ossification est alors créé au sein du tissu conjonctif. Il est composé de capillaires et de cellules souches mésenchymateuses. Ces dernières se différencient en ostéoblastes et sécrètent de l'ostéoïde qui, en se calcifiant, piège en son sein les ostéoblastes devenus alors des ostéocytes. Ce tissu osseux formé autour des capillaires deviendra de l'os trabéculaire et les ostéoblastes l'entourant formeront le périoste (Safadi et al. 2009). L'ossification intramembranaire commence *in utero* et se poursuit jusqu'à l'adolescence.

##### *L'ossification endochondrale*

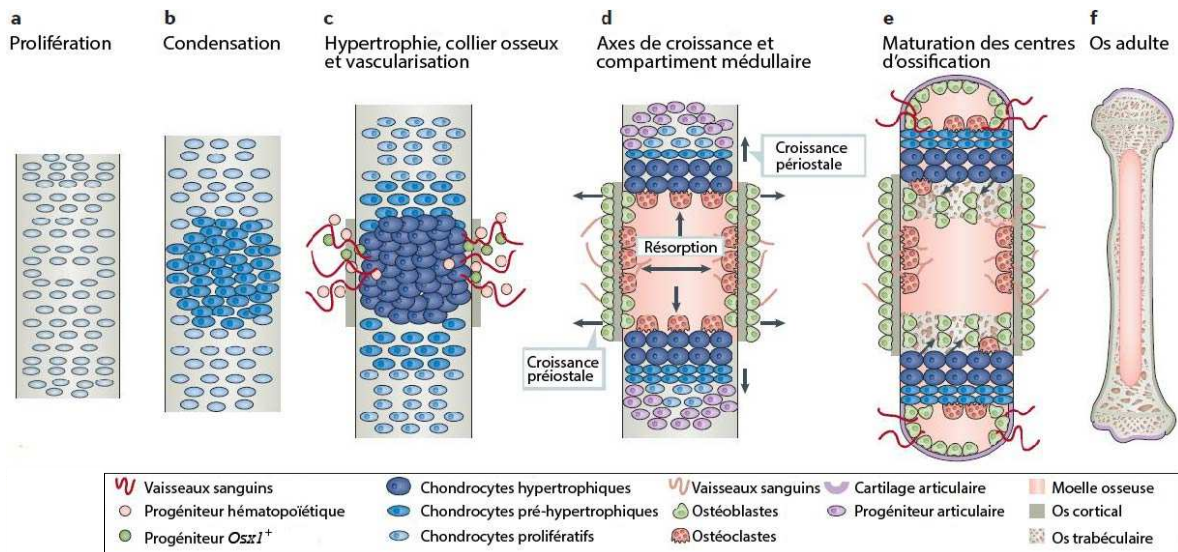
Ici, le processus d'ossification nécessite la présence d'un support cartilagineux (anlagen) qui va progressivement être remplacé par du tissu osseux minéralisé (Figure 1.15). Les os longs sont formés selon ce processus (Long and Ornitz 2013).

Dans un premier temps, des cellules souches mésenchymateuses vont se regrouper au site des futurs os, se condenser et former le patron cartilagineux du squelette (Figure 1.15-a) (Hall and Miyake 1992). Puis ces cellules vont se différencier en chondrocytes (Hall and Miyake 2000; Thorogood and Hinchliffe 1975), produire du cartilage et se retrouver piégées dans leur matrice (Figure 1.15-b) (Caplan 1987).

Le remplacement de ce tissu cartilagineux par de l'os minéralisé est déclenché par l'arrêt de la prolifération des chondrocytes et leur hypertrophie. Les chondrocytes vont alors sécréter des facteurs angiogéniques afin de créer une vascularisation au centre de la diaphyse des futurs os (Figure 1.15-c) (Caplan 1988; Ferrara et al. 1999; Maes et al. 2002). L'hypertrophie des chondrocytes entraîne leur mort par apoptose tandis que les vaisseaux nouvellement formés amènent au futur site d'ossification des progéniteurs ostéoblastiques, des cellules endothéliales, des cellules souches hématopoïétiques et des chondroclastes/ostéoclastes qui vont partiellement dégrader la matrice cartilagineuse (Goldring, Tsuchimochi, and Ijiri 2006; Ortega, Behonick, and Werb 2004). Le site d'ossification primaire est alors créé (Figure 1.15-d).

Les progéniteurs se différencient en ostéoblastes et produisent une matrice osseuse sur la base de la matrice cartilagineuse restante. Les cellules endothéliales et hématopoïétiques quant à elles s'implantent dans le site d'ossification primaire qui deviendra la cavité médullaire abritant la moelle osseuse (Figure 1.15-d) (Erlebacher et al. 1995; Maes et al. 2010).





**Figure 1.15 : Processus d'ossification endochondrale.** Au début de l'ossification endochondrale, les cellules souches mésenchymateuses prolifèrent (a) puis se condensent et se différencient en chondrocytes (b). Les chondrocytes deviennent ensuite hypertrophiques et sécrètent des facteurs qui vont permettre l'infiltration des vaisseaux sanguins et des cellules souches hématopoïétiques et stromales au sein de l'os dans le centre d'ossification primaire (c). Alors que les chondrocytes prolifèrent et induisent l'augmentation de la taille longitudinale de l'os, le cartilage articulaire se forme aux extrémités de l'os tandis qu'une cavité médullaire se crée au centre de la diaphyse de l'os à l'endroit où les ostéoclastes ont digéré la matrice cartilagineuse pour permettre la formation de tissu osseux (d). Autour de la diaphyse, on observe l'apparition du périoste dont le remodelage par les ostéoblastes sur sa surface externe entraîne l'augmentation du diamètre axial de l'os (d). Un second centre d'ossification est ensuite créé dans les épiphyses selon le même procédé que le premier centre dont il est séparé par la zone de cartilage de conjugaison (Salazar, Gamer, and Rosen 2016).

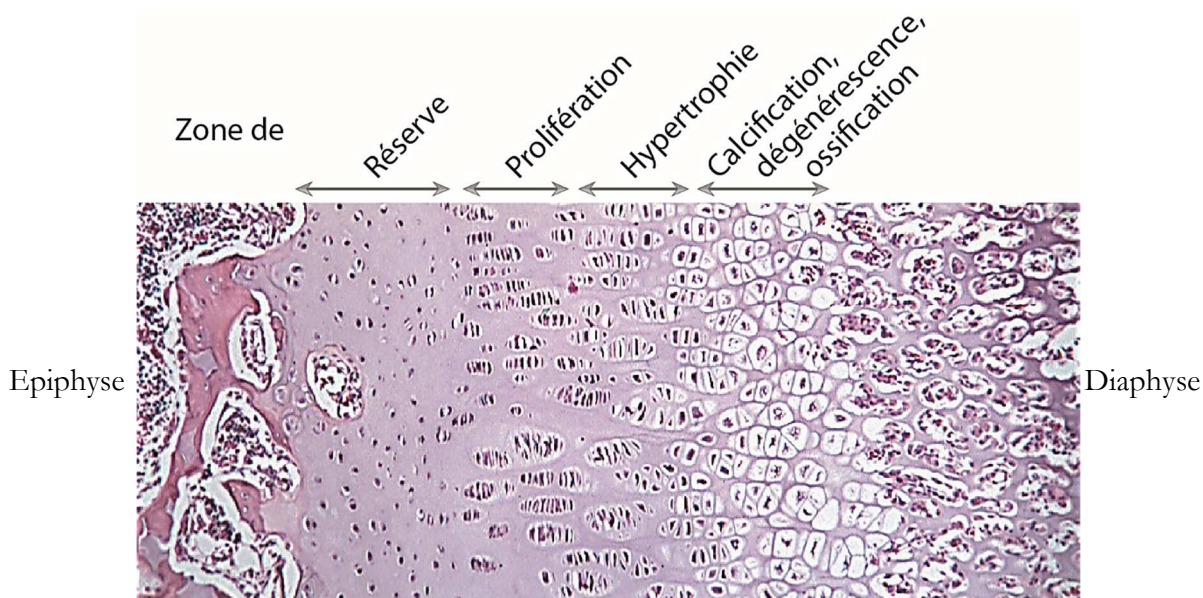
Avec la croissance du fœtus, le centre d'ossification primaire s'étend et un centre d'ossification secondaire se forme dans les épiphyses (Figure 1.15-e). Ces deux centres se retrouvent séparés de la cavité médullaire par le cartilage de conjugaison, qui va être responsable de la croissance longitudinale des os (Karsenty 2003; Kronenberg 2003).

### 1.3.3.2. Croissance

Bien que le patron du squelette soit entièrement formé à la naissance, celui-ci n'a pas encore sa taille adulte. Jusqu'à la fin de la puberté, les os vont croître en longueur, en largeur et en épaisseur par différents procédés.

*La croissance appositionnelle* (ou péri-chondrale) permet l'élargissement du diamètre externe de la diaphyse des os longs grâce à la prolifération et la différenciation des chondroblastes de la couche interne du péri-chondre (Kini and Nandeesh 2012).

*La croissance interstitielle* (ou longitudinale) permet la croissance axiale de l'os. Elle s'effectue par divisions successives des chondrocytes présents dans le cartilage de conjugaison. Ce dernier est composé de quatre zones dont l'activité cellulaire diffère grandement (Figure 1.16) (Cancedda et al. 2000).



**Figure 1.16 : Le cartilage de conjugaison.** Le cartilage de conjugaison se situe entre l'épiphyse et la diaphyse. Il est constitué de quatre zones distinctes de l'épiphyse vers la diaphyse : la zone de réserve, contenant des chondrocytes de petite taille ; la zone de prolifération, où les chondrocytes prolifèrent dans l'axe de l'os, induisant sa croissance en longueur ; la zone d'hypertrophie et la zone de dégradation des chondrocytes, infiltration des cellules osseuses et calcification de l'os. Crédit photo : The University of Kansas Medical Center

La zone de réserve contient un stock de chondrocytes de petite taille mobilisables. La zone de prolifération contient de larges chondrocytes qui se divisent selon l'axe longitudinal de l'os et dont l'activité mitotique est très importante. Avec la zone de maturation, qui renferme des chondrocytes hypertrophiés, elle est responsable de la croissance de l'os. Enfin, on retrouve dans la zone de calcification, de dégénérescence et d'ossification des chondrocytes dont l'apoptose est induite à la suite de la calcification de leur matrice (Figure 1.16). Cette dernière zone est la plus proche de la diaphyse. On y retrouve des capillaires et des ostéoblastes qui s'infiltrent dans le cartilage dégénéré et sécrètent du tissu osseux sur la matrice cartilagineuse restante (Cancedda et al. 2000).

Lorsque le stock de chondrocytes du cartilage de conjugaison est épuisé, la croissance longitudinale s'arrête et le cartilage de conjugaison restant est ossifié. L'individu a alors atteint sa taille adulte (Cancedda et al. 2000). De nombreux facteurs peuvent influencer la croissance du cartilage de conjugaison et ainsi accélérer ou ralentir la croissance des individus (Michigami 2013). Certains facteurs comme les hormones sexuelles ou l'hormone de croissance sont propres aux individus, tandis que d'autres tels que les traitements aux glucocorticoïdes ou la malnutrition sont considérés comme externes (Mackie et al. 2008; Mushtaq 2002).

Toutefois, malgré l'arrêt de sa croissance en longueur, le tissu osseux continue d'être remanié tout au long de la vie grâce à un processus portant le nom de remodelage osseux.

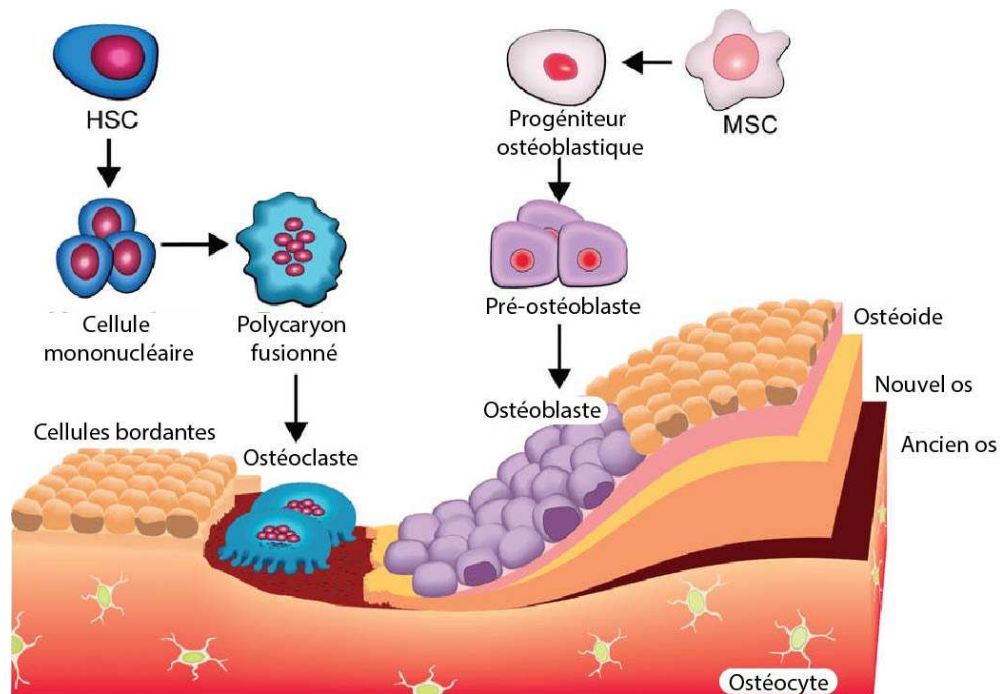
#### 1.3.3.3. Le remodelage osseux

Le remodelage osseux permet de remplacer le tissu osseux existant par du nouveau tissu osseux. Ce procédé a pour but de maintenir la force de l'os (en évitant l'accumulation de microfractures) et de réguler le métabolisme calcique et phosphatique.

C'est un processus de coopération entre les cellules ostéoformatrices (cellules ostéogéniques et ostéoblastes) et les ostéoclastes. Ensemble, ces cellules vont former transitoirement une « unité de remodelage osseux » dont le but est de résorber le tissu osseux pour en produire un nouveau, en meilleure santé (Andersen et al. 2009; Frost 1983).

Le processus de remodelage se décompose en quatre phases (Figure 1.17).

Lors de la phase d'activation, les cellules bordantes se rétractent de la matrice osseuse, libérant ainsi l'accès à la matrice osseuse pour les ostéoclastes. Parallèlement, les progéniteurs ostéoclastiques prolifèrent et se différencient pour former des ostéoclastes sous l'effet de la sécrétion de facteurs tels que le M-CSF et RANKL par les ostéoblastes (Nakashima et al. 2011; Xiong et al. 2011). Les ostéoclastes initient alors la phase de résorption osseuse en se fixant à la matrice et en la digérant (Teitelbaum 2000). Une fois la matrice résorbée, les ostéoclastes meurent par apoptose et la phase de réversion est initiée avec l'affluence de cellules ostéoprogénitrices au site de résorption. Enfin, au cours de la phase de formation, les ostéoblastes vont produire une nouvelle matrice osseuse organique (ostéoïde) puis la minéraliser, complétant ainsi le processus de remodelage osseux (Eriksen 1986).



**Figure 1.17 : Représentation schématique d'une unité de remodelage osseux.** De gauche à droite, le processus de remodelage osseux est initié par la rétraction des cellules bordantes (bone lining cells) de la matrice osseuse et la différenciation des ostéoclastes qui vont se fixer à la matrice afin de la digérer. Une fois que la matrice a été digérée par les ostéoclastes, les ostéoblastes vont se regrouper au site de résorption et synthétiser de l'ostéoïde qui sera ensuite minéralisé. Le remodelage osseux est alors complété. Adapté de Rahman et al. 2015.

Le remodelage osseux est un processus nécessaire qui permet l'homéostasie calcique, la réparation des fractures et l'adaptation du squelette aux forces mécaniques auxquelles il est sujet (Dallas, Prideaux, and Bonewald 2013). Dans les premières années de la vie, la masse osseuse

d'un individu va progressivement augmenter pour atteindre, à la fin de la puberté, son pic de masse osseuse (Bonjour et al. 1994). Le capital osseux reste ensuite stable pendant quelques années puis la balance entre la formation et la dégradation de l'os est déséquilibrée. La résorption osseuse devient plus importante que l'ostéoformation et conduit à l'ostéoporose (Demontiero, Vidal, and Duque 2012). Cette pathologie augmente considérablement le risque de fracture (Colón-Emeric and Saag 2006). Les hommes et les femmes en sont affectés, mais la perte osseuse est plus marquée chez la femme suite à la diminution de la production d'œstrogènes à la ménopause (Cooper, Campion, and Melton 1992).

L'os est donc un organe très structuré où de nombreux facteurs, voies de signalisation et types cellulaires interagissent afin de réguler son homéostasie. Les pathologies affectant le tissu osseux sont multiples et peuvent apparaître à différents stades du développement. Dans l'anémie de Fanconi, l'origine des malformations du système squelettique est encore inconnue. La prochaine section détaille l'état des connaissances actuelles sur le statut osseux des patients Fanconi.

#### **1.3.4. Le tissu osseux dans l'anémie de Fanconi**

Près de 40 % des patients Fanconi sont atteints de malformations du système squelettique (Shimamura and Alter 2010). Ces patients sont souvent de plus petite taille que la population générale et sont porteurs de malformations affectant plus particulièrement les membres supérieurs. Une des plus fréquentes observations est la diminution du nombre ou de la taille des carpes, telle que l'absence de pouce ou un pouce hypoplasique. Cette caractéristique est souvent associée à une absence de radius (radial ray anomaly) (Figure 1.18). L'absence de radius peut également être accompagnée d'un raccourcissement de l'ulna (Figure 1.18). Certains patients présentent aussi des malformations squelettiques en dehors des membres supérieurs, telles que des dislocations de la hanche, microcéphalies ou une forme de visage triangulaire très spécifique de l'anémie de Fanconi (Figure 1.4). Hormis les descriptions des différentes malformations congénitales observées chez les patients, les données sur leur statut osseux demeurent peu nombreuses.



**Figure 1.18 : Radiographie de la main gauche d'un patient atteint de l'anémie de Fanconi.** Le radius et le pouce sont absents de la main gauche tandis que l'ulna est hypoplasique ("Radiopaedia.org").

Bien que de précédents rapports ont mentionné une diminution de la taille chez les patients Fanconi (Wajnrajch et al. 2001), c'est en 2007 que Giri et collègues démontrèrent pour la première fois une diminution de la densité minérale osseuse associée à la présence d'ostéoporose ou ostéopénie chez les patients Fanconi (chez 92% des patients) (Giri et al. 2007). Peu après, une seconde étude est venue confirmer l'altération du tissu osseux dans le cadre de l'anémie de Fanconi. Celle-ci a mis en évidence la diminution de la densité minérale osseuse chez des patients, à la suite d'une transplantation de moelle osseuse (Petryk et al. 2006). Mais ces résultats sont débattus, car une autre analyse a démontré que de la densité minérale osseuse, une fois ajustée selon la taille de l'os, la taille des patients et à leur âge, est similaire entre les patients Fanconi ayant subi ou non une transplantation (Rose et al. 2011). De plus, il est courant d'observer une diminution de la densité minérale osseuse suite à une transplantation de moelle osseuse, ce qui pourrait indiquer que l'altération du tissu osseux est due aux traitements (Kulak et al. 2012; McClune and Majhail 2013).

On peut toutefois remarquer que les deux dernières études contradictoires sont difficilement comparables puisque la première n'ajuste pas la densité minérale osseuse à la taille des patients et la seconde compare des groupes de patients différents. Au vu de la grande hétérogénéité dans le phénotype des patients Fanconi, les études de suivi restent plus robustes que les comparaisons entre deux groupes de patients dont le facteur étudié, ici la transplantation, n'est pas la seule variable qui intervient.



Enfin, deux études plus récentes encore, mettent en évidence une diminution de la densité minérale osseuse chez les enfants atteints de l'anémie de Fanconi après ajustement de la densité minérale osseuse à la taille des patients, en l'absence et après transplantation de moelle osseuse (Petryk, Polgreen, et al. 2015; Shankar et al. 2017).

L'ensemble de ces résultats indique que la densité minérale osseuse des patients Fanconi semble être réduite chez les patients Fanconi non transplantés et que la transplantation de moelle osseuse aggraverait l'ostéoporose déjà présente. Comme les traitements et les stades de maturité hormonale diffèrent grandement entre les patients étudiés (enfants, femmes ménopausées, traitement aux androgènes, aux stéroïdes, transplantation de moelle osseuse), il est difficile de déterminer si la faible densité minérale osseuse est due aux traitements préalables, au statut hormonal des patients ou s'ils sont inhérents au système squelettique lui-même. Cependant, deux études effectuées avec des cellules mésenchymateuses des patients Fanconi soutiennent une altération potentielle du système squelettique indépendante des traitements. En effet, il a été démontré que les cellules mésenchymateuses des patients Fanconi entrent précocement en sénescence et ont une capacité de prolifération inférieure à celle des individus non Fanconi (Lecourt et al. 2010; Mantelli et al. 2015). Mais les études chez les patients restent trop rares.

L'utilisation de modèles murins de la maladie de Fanconi permet de pallier les variations de sexe, d'âge ou de traitement médical entre les patients. Comme les modèles murins déplétés en protéine Fanconi ne développent pas, sinon après la puberté, des pathologies hématologiques, ils nous permettent également d'étudier le tissu osseux au cours du développement et jusqu'à l'âge adulte sans l'influence de pathologies hématologiques ou cancers (Cerabona, Sun, and Nalepa 2016). Pourtant, peu d'études se sont intéressées jusqu' alors au système squelettique chez la souris Fanconi. Et ce malgré le fait que de nombreux modèles murins Fanconi (déplétés en protéine FANCA, FANCC, FANCD2, FANCP, et FANCC/FANCG : *FancA*<sup>-/-</sup>, *FancC*<sup>-/-</sup>, *FancD2*<sup>-/-</sup>, *FancP*<sup>-/-</sup> et *FancC*<sup>-/-</sup>/*FancG*<sup>-/-</sup>) présentent un retard de croissance et/ou des défauts squelettiques (Crossan et al. 2011; Houghtaling et al. 2003; Wong et al. 2003; Zhou et al. 2017). Il a précédemment été démontré que les cellules souches mésenchymateuses des souris déplétées en protéine FANCG ont une capacité de prolifération réduite par rapport à celle des souris sauvages (Li et al. 2009). De plus, elles ont également une capacité de soutien dans la prise de la greffe inférieure à celles des cellules sauvages lorsqu'elles sont injectées avec des cellules souches

hématopoïétiques sauvages (Li et al. 2009). Dernièrement, des études effectuées sur un modèle de doubles mutants déplétés en protéine FANCG et FANCC, *FancC*<sup>-/-</sup>/*FancG*<sup>-/-</sup>, ont récemment mis en évidence une diminution de la formation osseuse dans ce modèle murin due à un défaut de différenciation ostéoblastique des CSM (cellules souches mésenchymateuses). Cette étude est la première à explorer l'activité du tissu osseux dans le contexte de l'anémie de Fanconi. Toutefois, elle a été réalisée dans un modèle de doubles mutants et sur des souris âgées de 6 mois, un âge trop avancé pour évaluer des problèmes développementaux chez la souris (Zhou et al. 2017).

L'ensemble de ces résultats semblent mettre en évidence une altération du tissu osseux chez les patients Fanconi, mais également chez les souris Fanconi. Cette altération semble indépendante du statut hormonal des patients ou des traitements et propre au système squelettique. Cette théorie est soutenue par l'observation de l'élévation de la concentration de Dkk1 dans le plasma des souris Fanconi *FancA*<sup>-/-</sup> et *FancC*<sup>-/-</sup> (Haneline et al. 1999; Huard et al. 2014; Wong et al. 2003). Une protéine dont la concentration sérique corrèle négativement avec la densité minérale osseuse (Butler et al. 2011).



#### 1.4. Hypothèse de travail

Chez les patients Fanconi, le système hématopoïétique est souvent le premier à montrer des signes de défaillance mettant en danger la vie du patient (Auerbach 2009; Mehta and Tolar 1993). La prise en charge du patient sur le plan hématologique est donc la priorité du corps médical.

Cela étant, la présence de malformations squelettiques chez les patients Fanconi est fréquemment rapportée dans la littérature (Auerbach 2009; Shimamura and Alter 2010). Soixante-quinze pour cent des patients sont porteurs de malformations affectant la croissance ou la formation du patron osseux (Shimamura and Alter 2010). Les protéines Fanconi seraient donc impliquées dans le développement de ce système.

Au sein du laboratoire, nous avons observé une surélévation de la concentration plasmatique de Dkk1 dans le plasma de nos modèles murins *FancA*<sup>-/-</sup> et *FancC*<sup>-/-</sup>. Cette protéine est impliquée dans le développement du système squelettique, mais aussi dans l'homéostasie du tissu osseux chez l'adulte (Church and Francis-West 2002; MacDonald 2004; Nie 2005). Chez la souris, la surexpression de DKK1 par les ostéoblastes conduit à une ostéopénie (Fleming et al. 2008). Chez l'humain, on observe une corrélation entre l'augmentation de la concentration de DKK1 dans le sang et la diminution de la densité osseuse (Butler et al. 2011).

Mon hypothèse de travail est que la surexpression de Dkk1 reflète une altération du tissu osseux chez les souris Fanconi *FancA*<sup>-/-</sup> et *FancC*<sup>-/-</sup>.

Étant donné que peu de données sont disponibles sur le développement du système squelettique, et plus particulièrement le tissu osseux, dans l'anémie de Fanconi, mon premier objectif de recherche est de caractériser le développement embryonnaire du système squelettique dans l'anémie de Fanconi à l'aide de deux modèles murins de l'anémie de Fanconi, les souris *FancA*<sup>-/-</sup> et *FancC*<sup>-/-</sup>.

Bien que le statut osseux des patients Fanconi avant transplantation de moelle osseuse soit encore débattu dans la littérature, plusieurs études démontrent une diminution de la densité

minérale osseuse chez les patients après transplantation (Petryk et al. 2006; Petryk, Polgreen, et al. 2015; Shankar et al. 2017). Mais nous ne savons pas si ces observations sont inhérentes au système squelettique ou si elles résultent de la transplantation, des traitements ou du statut hormonal des patients.

Il a été démontré dans la littérature que les cellules souches mésenchymateuses des patients et des modèles murins *FancG*<sup>-/-</sup> et *FancC*<sup>-/-</sup>/*FancG*<sup>-/-</sup> ont une capacité de soutien des cellules souches hématopoïétiques réduites (Li et al. 2009; Zhou et al. 2017). De plus, il a été démontré que les cellules souches mésenchymateuses *FancC*<sup>-/-</sup>/*FancG*<sup>-/-</sup> ont une capacité de différenciation ostéoblastique inférieure à celle des cellules de souris sauvages.

Il y est donc très probable qu'il existe une réelle pathologie osseuse sous-jacente dans le contexte d'une anémie de Fanconi, qui affecte le développement du système squelettique et qui, chez les patients, peut être aggravée par les traitements utilisés pour pallier la défaillance médullaire. Mon second objectif de recherche est d'étudier l'intégrité et l'activité métabolique du tissu osseux chez la souris adulte afin d'identifier les défauts osseux potentiels ainsi que les mécanismes y conduisant.

**Chapitre 2 : Modulating Dickkopf-1: A Strategy to Monitor or Treat  
Cancer?**

## Modulating Dickkopf-1: A Strategy to Monitor or Treat Cancer?

Mélody Mazon <sup>1</sup>, Delphine Masi <sup>1</sup> and Madeleine Carreau <sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> CHU de Québec Research Center, 2705 Boulevard Laurier, RC-9800, Québec, QC G1V 4G2, Canada; melody.mazon@chudequebec.ulaval.ca (M.M.); delphine.masi@chudequebec.ulaval.ca (D.M.)

<sup>2</sup> Department of Pediatrics, Université Laval, Québec, QC G1V 0A6, Canada

\* Correspondence: madeleine.carreau@crchul.ulaval.ca; Tel.: +1-418-525-4444 (ext. 47828)

CC BY 4.0

## 2.1. Résumé

DKK1 est une protéine sécrétée impliquée dans l'embryogénèse et plus particulièrement dans l'induction de la tête et la morphogénèse des membres. Cette protéine agit en tant qu'antagoniste de la voie Wnt /  $\beta$ -caténine. Depuis sa découverte 25 ans plus tôt, le rôle de DKK1 a été largement étudié dans le contexte de la signalisation Wnt /  $\beta$ -caténine au cours de la différenciation cellulaire et du développement. La dysrégulation de DKK1 est associée à des pathologies osseuses et cette protéine apparaît aujourd'hui comme un biomarqueur potentiel de la progression du cancer et du pronostic dans plusieurs maladies. Réduire la quantité de DKK1 circulant peut se révéler une stratégie simple et efficace pour limiter la croissance tumorale ou l'activité métastatique des cellules cancéreuses. Cette revue apporte un aperçu du rôle de Dickkopf-1 dans le cancer et explore son utilisation potentielle en tant que biomarqueur et cible thérapeutique.

## 2.2. Abstract

Dickkopf-1 (DKK1) is a secreted Wnt/ $\beta$ -catenin pathway antagonist involved in embryogenesis. It was first described 25 years ago for its function in head induction and limb morphogenesis. Since then, this protein has been widely studied in the context of active Wnt/ $\beta$ -catenin signalling during cellular differentiation and development. Dysregulation of DKK1 has been associated with bone pathologies and has now emerged as a potential biomarker of cancer progression and prognosis for several types of malignancies. Reducing the amount of circulating DKK1 may reveal a simple and efficient strategy to limit or reverse cancer growth. This review will provide an overview of the role of Dickkopf-1 in cancer and explore its potential use as a biomarker and therapeutic target.

### 2.3. Introduction

The Wnt signalling cascade orchestrates a wide variety of biological processes throughout life such as cell division, proliferation, and differentiation [1–3]. These cellular processes are required for tissue development and homeostasis. Wnt signalling is either canonical or non-canonical according to the role played by the effector protein  $\beta$ -catenin. The canonical Wnt/ $\beta$ -catenin pathway is activated following binding of secreted Wnt ligands to their transmembrane receptors of the Frizzled family. This leads to the formation of a cell surface ternary complex composed of a Wnt co-receptor, mainly the low-density lipoprotein receptor-related proteins 5 and 6 (LRP5/6). This protein complex triggers activation of the signalling pathway that, through several cytoplasmic relay components, leads to cytoplasmic accumulation of  $\beta$ -catenin, its translocation to the nucleus and its activation of target genes. To assure a well-organized and timely sequence of events needed for accurate tissue development, Wnt pathways, both canonical and non-canonical are highly regulated. It is therefore not surprising that many types of regulatory proteins have emerged over the course of evolution. These include both intra- and extracellular regulators that modulate activation and repression of Wnts [4]. Of those, the Dickkopf (DKK) family are secreted Wnt/ $\beta$ -catenin antagonists composed of four isoforms, DKK-1 to 4 and one DKK3-related member (DKKL1 or Soggy) [5–7]. Among them, DKK1 antagonizes the Wnt/ $\beta$ -catenin signal allowing fine-tuning of signalling events through a feedback loop mechanism. Consequently, dysregulation in any steps of the Wnt/ $\beta$ -catenin signal including DKK1-mediated repression leads to numerous developmental abnormalities and diseases, with the most widely studied being cancer [3,8]. This review will focus on the role of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway antagonist, Dickkopf-1, as a biomarker of cancer and therapeutic target.

### 2.4. DKK1 Gene Expression and Protein Structure

DKK1's ability to inhibit the canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway relies on its capacity to bind simultaneously the transmembrane receptors Kremen-1 or 2 (KRM1/2) and the Wnt/ $\beta$ -catenin co-receptor LRP5/6 [9–14]. This extracellular binding leads to endocytosis of the DKK1-associated complex that includes KRM1/2 and LRP5/6 [13,15]. Absence of the

co-receptor at the cell membrane impairs a subsequent activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signalling. Following internalization, the co-receptor LRP5/6 is recycled to the cell-surface membrane, while DKK1 is shuttled to the lysosome for its degradation. Although the inhibitory functions of DKK1 in the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway have been identified first, it was later found that the DKK1 gene is also a target of Wnt/ $\beta$ -catenin activation [16–18]. In fact, the DKK1 promoter region contains several putative T-cell factor (TCF)-binding sites and was shown to be a direct target of activated  $\beta$ -catenin. In addition, secreted DKK1 could block its own transcription, thus creating a negative feedback loop [17]. Transcriptional repression of DKK1 has been shown to be mediated by the C-terminal binding protein 1 (CtBP1) in association with the Fanconi anemia C protein (FANCC) [19,20]. Beside TCF/ $\beta$ -catenin, Osterix, an osteoblast-specific transcription factor required for bone formation and differentiation, has been identified as a direct transcriptional activator of the *Dkk1* promoter [21]. Although DKK1 transcription has been shown to be responsive to other signals and pathways such as apoptotic stimuli or following genotoxic stress, the actual transcription factor directly activating DKK1 in these cases have not been identified [22–27]. Based on public genome databases, the DKK1 promoter possesses several other putative transcription factor recognition sites and with further study, these may provide new insights on DKK1's regulation.

The human DKK1 gene maps to chromosome 10q11.2 and encodes 266 amino acids protein [5,28]. This protein contains six secondary structures: Two alpha helices, four  $\beta$ -sheets, and two highly conserved cysteine-rich domains (CRD-1 and CRD-2) separated by a linker region of variable-length [5,6,29]. The first CRD-1 domain is unique to DKK family members and the carboxy-terminal CRD-2 is highly conserved and folded in a Colipase-like domain containing disulfide bonds and short  $\beta$ -strands [30–32]. This C-terminal domain is necessary and sufficient to inhibit canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signalling. Various post-translational modifications can be found on DKK1, such as phosphorylation and glycosylation [31]. However, the role of these post-translational modifications in Wnt/ $\beta$ -catenin signalling need to be further explored.

## **2.5. DKK1 Protein Function in Development**

DKK1 was first described as a head inducer in *Xenopus* during embryogenesis [33]. Subsequently, DKK1 has been detected in other vertebrates, including humans, and in some



invertebrates (Dictyostelium, Cnidarians, Urochordates, and Ascidians) excluding *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans* [34]. Earliest expression of *xdkk1* localized in tissues associated with anterior specification such as the Spemann organizer [33]. In mouse embryos, *Dkk1* is first detected at 6.5 days post-conception and marks head mesoderm cells [33]. Other developmental models also showed that *Dkk1* expression played an important role in head patterning but also showed its involvement in the formation and patterning of different organs and tissues including the eye, heart, limb vertebra, skin and bone [7,29,35]. For instance, *Dkk1* knockdown and knockout models lacked anterior head structures and anomalies in limb formation and digit patterning. To counteract embryonic lethality of the knockout mouse model, a double-ridge mouse model has been created [36,37]. This viable and fertile model contains a hypomorphic *Dkk1* allele allowing 10% of *Dkk1* expression. This mouse model shows normal head development but postaxial polysyndactyly further supporting the involvement of DKK1 in digit patterning. Indeed, DKK1 involvement in limb formation has been strengthened by different DKK1 overexpression models, in which limb truncation and expansion of the limb growth-controlling zone is observed in chicks. Mechanistically, DKK1 functions as an inducer of apoptosis of interdigital mesenchymal cells within the cell death zone allowing correct patterning of the digits [24]. DKK1 seems also implicated in skin development as shown by a hairless phenotype in DKK1-overexpressing mice, altered melanocyte proliferation and differentiation, decreased melanin transfer from melanocytes to keratinocytes and reduced pigmentation and thickness of the skin [38,39]. Other studies have highlighted a role of DKK1 in bone metabolism. For instance, knockdown and knockout studies have shown an increase bone mineral density whereas DKK1 overexpression is associated with osteopenia in mice [40–42]. In support of these findings, DKK1 antibody treatments increased trabecular bone volume and bone mineral density. In humans, high DKK1 levels in peripheral blood correlates with a decrease in bone density, while mutations in LRP5 that impede binding to DKK1 result in high bone density [43–45]

## **2.6. DKK1 as a Biomarker of Cancer Initiation and Progression**

The first hint that DKK1 could serve as a biomarker of pathophysiologic conditions came from the study of Tian et al. showing abnormally high levels of DKK1 in plasma from patients with multiple myeloma (MM) [45]. In this study, the authors compared expression of a panel of genes in patients with MM in the presence or absence of osteolytic lesions and found elevated

levels of DKK1 detectable in peripheral blood of the patients with bone lesions. DKK1 levels in plasma correlated with gene expression pattern of *DKK1* in plasma cells. This study suggested that DKK1 could serve as a marker for MM progression and that cancer mediated modulations of DKK1 influences bone metabolism. This led to an interest in studying *DKK1* expression and protein levels in patients with cancers known to induce osteolytic lesions. One such case is osteosarcoma (OS), an aggressive malignant neoplasm, which occurs when mesenchymal cells are transformed. Studies in paediatric patients with OS showed significantly elevated levels of DKK1 in serum of patients with maximal DKK1 expression detected in tumour cells and tumour-surrounding cells [46]. These results support the idea that DKK1 could serve as a diagnostic tool for cancer-mediated bone lesions. In fact, Hall et al. showed that DKK1 plasma levels rise when prostate cancer cells metastasize to bone and induce osteolytic lesions [47–49]. Although increased serum DKK1 seemed to be an early event in prostate cancer, which declines as cancer progresses, high DKK1 levels were associated with shorter overall survival suggesting that DKK1 could serve as a cancer prognostic marker [50]. Indeed, this was shown to be the case for patients suffering from triple-negative breast cancer subtypes, non-small cell lung cancer, esophageal squamous cell carcinoma, urothelial carcinoma and bladder cancer, gynaecological cancers or hepatocellular carcinoma (HCC) where high levels of DKK1 correlated with poor survival [51–61]. Other studies also showed elevated levels of DKK1 in patients' sera or tumour specimen from a squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN), including esophageal and laryngeal tissues [62–64]. These studies combined with those from Peng et al. suggest that measurement of serum DKK1 combined with the presence of autoantibodies against DKK1 could serve as an early screening process for SCCHN, but also as an alternative to invasive screening, notably endoscopic examination followed by histological biopsy [65]. Because the presence of DKK1 in sera correlated with different types of cancers, Sato et al. analyzed DKK1 levels in serum samples from 906 patients with cancers of either the pancreas, stomach, liver, bile duct, breast and cervix [66]. The majority of cancer patients presented elevated DKK1 levels compared to healthy controls and thus confirmed previous data supporting the usefulness of DKK1 as a serological biomarker of cancer. In addition, a large-scale multicenter study was performed with patients affected by liver diseases including HCC, chronic hepatitis B virus (HBV) or liver cirrhosis to assess whether DKK1 could serve as an alternative biomarker to alpha-fetoprotein (AFP) for HCC diagnosis [67]. Their results showed that elevated serum DKK1 concentration could help distinguish patients with HCC from those

with cirrhosis and HBV infections. However, a recent study showed that AFP remained the best single marker for HCC but in combination with DKK1 had the best diagnostic performance [68]. Together, these studies suggest that levels of DKK1 might serve as a prognostic tool of cancer initiation and progression. However, there are conflicting studies showing down regulation or silenced expression of DKK1 in cancers. These include intestinal and colon cancers where *DKK1* transcriptional silencing is the result of promoter hypermethylation [17,69]. It has also been proposed that DKK1 silencing in colon cancer suggests a tumour suppressor role for DKK1 and thus the need for its repression to allow tumour growth. This paradoxical behaviour of DKK1 might be explained by its subcellular location and associated function. Indeed, DKK1 nuclear staining was observed in colon cancer cells and associated with increased expression of genes involved in cellular detoxification and survival [70,71]. This nuclear activity of DKK1 correlated with chemoresistance and decreased survival in colorectal cancer patients. Although DKK1 gene silencing was seen in colorectal tumour cells, Gurluler et al. showed elevated DKK1 levels in serum of patients suffering from stages II and III colon cancer, with higher levels in stage III than in stage II [72]. Increased DKK1 levels in later stages of colon cancer may be indicative of tumour invasion, differentiation and metastasis thus supporting a role of DKK1 as a prognostic factor. Accordingly, a meta-analysis of the prognostic value of DKK1 in gastric cancer showed that DKK1 correlated with tumour invasion and poor survival [73]. These different studies suggest that the detection of elevated DKK1 levels in the plasma of patients correlates with tumorigenesis from various types of tissues. Therefore, DKK1 may be a good candidate protein to monitor cancer both as a diagnostic tool and as a prognostic indicator.

## 2.7. Conclusions

The DKK1 protein has lately become a focus of attention in cancer research, both as a biomarker and potential therapeutic target. Mechanisms leading to upregulation of DKK1 in many cancers are beginning to emerge. For instance, some have highlighted a role of DKK1 in cancer growth through upregulation of stress response genes, such as the *Aldehyde dehydrogenase 1A1*, which is involved in detoxification of chemotherapeutic agents. This mechanism would predict chemoresistance in patients where levels of DKK1 are found elevated. The fact that many different cancers provoke an overexpression of this protein in the blood of patients makes it a promising tool for the clinic.

## 2.8. Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR).

## 2.9. Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

## 2.10. References

1. Willert, K.; Brown, J.D.; Danenberg, E.; Duncan, A.W.; Weissman, I.L.; Reya, T.; Yates, J.R., 3rd; Nusse, R. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* **2003**, *423*, 448–452.
2. Wodarz, A.; Nusse, R. Mechanisms of Wnt signalling in development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1998**, *14*, 59–88.
3. Logan, C.Y.; Nusse, R. The Wnt signalling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2004**, *20*, 781–810.
4. Cruciat, C.M.; Niehrs, C. Secreted and transmembrane Wnt inhibitors and activators. *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* **2013**, *5*, a015081.
5. Fedi, P.; Bafico, A.; Nieto Soria, A.; Burgess, W.H.; Miki, T.; Bottaro, D.P.; Kraus, M.H.; Aaronson, S.A. Isolation and biochemical characterization of the human DKK-1 homologue, a novel inhibitor of mammalian Wnt signalling. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 19465–19472.
6. Krupnik, V.E.; Sharp, J.D.; Jiang, C.; Robison, K.; Chickering, T.W.; Amaravadi, L.; Brown, D.E.; Guyot, D.; Mays, G.; Leiby, K.; et al. Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. *Gene* **1999**, *238*, 301–313.
7. Monaghan, A.P.; Kioschis, P.; Wu, W.; Zuniga, A.; Bock, D.; Poustka, A.; Delius, H.; Niehrs, C. Dickkopf genes are co-ordinately expressed in mesodermal lineages. *Mech. Dev.* **1999**, *87*, 45–56.
8. Clevers, H. Wnt/beta-catenin signalling in development and disease. *Cell* **2006**, *127*, 469–480.
9. Bafico, A.; Liu, G.; Yaniv, A.; Gazit, A.; Aaronson, S.A. Novel mechanism of wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/arrow. *Nat. Cell Biol.* **2001**, *3*, 683–686.
10. Bourhis, E.; Tam, C.; Franke, Y.; Bazan, J.F.; Ernst, J.; Hwang, J.; Costa, M.; Cochran, A.G.; Hannoush, R.N. Reconstitution of a frizzled8.Wnt3a.Lrp6 signalling complex reveals multiple wnt and DKK1 binding sites on lrp6. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 9172–9179.
11. Bourhis, E.; Wang, W.; Tam, C.; Hwang, J.; Zhang, Y.; Spittler, D.; Huang, O.W.; Gong, Y.; Estevez, A.; Zilberleyb, I.; et al. Wnt antagonists bind through a short peptide to the first beta-propeller domain of LRP5/6. *Structure* **2011**, *19*, 1433–1442.

12. Semenov, M.V.; Tamai, K.; Brott, B.K.; Kuhl, M.; Sokol, S.; He, X. Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr. Biol.* **2001**, *11*, 951–961.
13. Mao, B.; Wu, W.; Davidson, G.; Marhold, J.; Li, M.; Mechler, B.M.; Delius, H.; Hoppe, D.; Stannek, P.; Walter, C.; et al. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* **2002**, *417*, 664–667.
14. Mao, B.; Wu, W.; Li, Y.; Hoppe, D.; Stannek, P.; Glinka, A.; Niehrs, C. LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* **2001**, *411*, 321–325.
15. Sakane, H.; Yamamoto, H.; Kikuchi, A. LRP6 is internalized by DKK1 to suppress its phosphorylation in the lipid raft and is recycled for reuse. *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 360–368.
16. Chamorro, M.N.; Schwartz, D.R.; Vonica, A.; Brivanlou, A.H.; Cho, K.R.; Varmus, H.E. FGF-20 and DKK1 are transcriptional targets of beta-catenin and FGF-20 is implicated in cancer and development. *EMBO J.* **2005**, *24*, 73–84.
17. Gonzalez-Sancho, J.M.; Aguilera, O.; Garcia, J.M.; Pendas-Franco, N.; Pena, C.; Cal, S.; Garcia de Herreros, A.; Bonilla, F.; Munoz, A. The Wnt antagonist Dickkopf-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer. *Oncogene* **2005**, *24*, 1098–1103.
18. Niida, A.; Hiroko, T.; Kasai, M.; Furukawa, Y.; Nakamura, Y.; Suzuki, Y.; Sugano, S.; Akiyama, T. DKK1, a negative regulator of wnt signalling, is a target of the beta-catenin/TCF pathway. *Oncogene* **2004**, *23*, 8520–8526.
19. Huard, C.; Tremblay, C.S.; Helsper, K.; Delisle, M.C.; Schindler, D.; Levesque, G.; Carreau, M. Fanconi anemia proteins interact with CtBP1 and modulate the expression of the Wnt antagonist Dickkopf-1. *Blood* **2013**, *121*, 1729–1739.
20. Huard, C.C.; Tremblay, C.S.; Magron, A.; Levesque, G.; Carreau, M. The fanconi anemia pathway has a dual function in Dickkopf-1 transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 2152–2157.
21. Zhang, C.; Cho, K.; Huang, Y.; Lyons, J.P.; Zhou, X.; Sinha, K.; McCrea, P.D.; de Crombrughe, B. Inhibition of Wnt signalling by the osteoblast-specific transcription factor osterix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 6936–6941.
22. Wang, J.; Shou, J.; Chen, X. Dickkopf-1, an inhibitor of the Wnt signalling pathway, is induced by p53. *Oncogene* **2000**, *19*, 1843–1848.
23. Colla, S.; Zhan, F.; Xiong, W.; Wu, X.; Xu, H.; Stephens, O.; Yaccoby, S.; Epstein, J.; Barlogie, B.; Shaughnessy, J.D., Jr. The oxidative stress response regulates DKK1 expression through the jnk signalling cascade in multiple myeloma plasma cells. *Blood* **2007**, *109*, 4470–4477.
24. Grotewold, L.; Ruther, U. The wnt antagonist Dickkopf-1 is regulated by Bmp signalling and c-Jun and modulates programmed cell death. *EMBO J.* **2002**, *21*, 966–975.
25. Shou, J.; Ali-Osman, F.; Multani, A.S.; Pathak, S.; Fedi, P.; Srivenugopal, K.S. Human DKK-1, a gene encoding a Wnt antagonist, responds to DNA damage and its overexpression sensitizes brain tumour cells to apoptosis following alkylation damage of DNA. *Oncogene* **2002**, *21*, 878–889.

26. Yang, G.; Zhang, G.; Pittelkow, M.R.; Ramoni, M.; Tsao, H. Expression profiling of UVB response in melanocytes identifies a set of p53-target genes. *J. Investig. Dermatol.* **2006**, *126*, 2490–2506.
27. Aguilera, O.; Pena, C.; Garcia, J.M.; Larriba, M.J.; Ordonez-Moran, P.; Navarro, D.; Barbachano, A.; Lopez de Silanes, I.; Ballestar, E.; Fraga, M.F.; et al. The wnt antagonist Dickkopf-1 gene is induced by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 associated to the differentiation of human colon cancer cells. *Carcinogenesis* **2007**, *28*, 1877–1884.
28. Roessler, E.; Du, Y.; Glinka, A.; Dutra, A.; Niehrs, C.; Muenke, M. The genomic structure, chromosome location, and analysis of the human DKK1 head inducer gene as a candidate for holoprosencephaly. *Cytogenet. Cell Genet.* **2000**, *89*, 220–224.
29. Grotewold, L.; Theil, T.; Ruther, U. Expression pattern of DKK-1 during mouse limb development. *Mech. Dev.* **1999**, *89*, 151–153.
30. Aravind, L.; Koonin, E.V. A colipase fold in the carboxy-terminal domain of the Wnt antagonists—the Dickkopfs. *Curr. Biol.* **1998**, *8*, R477–R478.
31. Haniu, M.; Horan, T.; Spahr, C.; Hui, J.; Fan, W.; Chen, C.; Richards, W.G.; Lu, H.S. Human Dickkopf-1 (huDKK1) protein: Characterization of glycosylation and determination of disulfide linkages in the two cysteine-rich domains. *Protein Sci.* **2011**, *20*, 1802–1813.
32. Brott, B.K.; Sokol, S.Y. Regulation of Wnt/LRP signalling by distinct domains of Dickkopf proteins. *Mol Cell Biol* **2002**, *22*, 6100–6110.
33. Glinka, A.; Wu, W.; Delius, H.; Monaghan, A.P.; Blumenstock, C.; Niehrs, C. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* **1998**, *391*, 357–362.
34. Niehrs, C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene* **2006**, *25*, 7469–7481.
35. Mukhopadhyay, M.; Shtrom, S.; Rodriguez-Esteban, C.; Chen, L.; Tsukui, T.; Gomer, L.; Dorward, D.W.; Glinka, A.; Grinberg, A.; Huang, S.P.; et al. Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Dev. Cell* **2001**, *1*, 423–434.
36. Adamska, M.; MacDonald, B.T.; Meisler, M.H. Doubleridge, a mouse mutant with defective compaction of the apical ectodermal ridge and normal dorsal-ventral patterning of the limb. *Dev. Biol.* **2003**, *255*, 350–362.
37. MacDonald, B.T.; Adamska, M.; Meisler, M.H. Hypomorphic expression of DKK1 in the doubleridge mouse: Dose dependence and compensatory interactions with LRP6. *Development* **2004**, *131*, 2543–2552.
38. Chang, H.Y. Patterning skin pigmentation via Dickkopf. *J. Investig. Dermatol.* **2007**, *127*, 994–995.
39. Yamaguchi, Y.; Passeron, T.; Hoashi, T.; Watabe, H.; Rouzaud, F.; Yasumoto, K.; Hara, T.; Tohyama, C.; Katayama, I.; Miki, T.; et al. Dickkopf 1 (DKK1) regulates skin pigmentation and thickness by affecting Wnt/beta-catenin signalling in keratinocytes. *FASEB J.* **2008**, *22*, 1009–1020.

40. Li, J.; Sarosi, I.; Cattle, R.C.; Pretorius, J.; Asuncion, F.; Grisanti, M.; Morony, S.; Adamu, S.; Geng, Z.; Qiu, W.; et al. DKK1-mediated inhibition of Wnt signalling in bone results in osteopenia. *Bone* **2006**, *39*, 754–766.
41. Glantschnig, H.; Hampton, R.A.; Lu, P.; Zhao, J.Z.; Vitelli, S.; Huang, L.; Haytko, P.; Cusick, T.; Ireland, C.; Jarantow, S.W.; et al. Generation and selection of novel fully human monoclonal antibodies that neutralize Dickkopf-1 (DKK1) inhibitory function in vitro and increase bone mass in vivo. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 40135–40147.
42. MacDonald, B.T.; Joiner, D.M.; Oyserman, S.M.; Sharma, P.; Goldstein, S.A.; He, X.; Hauschka, P.V. Bone mass is inversely proportional to DKK1 levels in mice. *Bone* **2007**, *41*, 331–339.
43. Butler, J.S.; Murray, D.W.; Hurson, C.J.; O'Brien, J.; Doran, P.P.; O'Byrne, J.M. The role of Dkk1 in bone mass regulation: Correlating serum DKK1 expression with bone mineral density. *J. Orthop. Res.* **2011**, *29*, 414–418.
44. Boyden, L.M.; Mao, J.; Belsky, J.; Mitzner, L.; Farhi, A.; Mitnick, M.A.; Wu, D.; Insogna, K.; Lifton, R.P. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N. Engl. J. Med.* **2002**, *346*, 1513–1521.
45. Tian, E.; Zhan, F.; Walker, R.; Rasmussen, E.; Ma, Y.; Barlogie, B.; Shaughnessy, J.D., Jr. The role of the Wnt-signalling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349*, 2483–2494.
46. Lee, N.; Smolarz, A.J.; Olson, S.; David, O.; Reiser, J.; Kutner, R.; Daw, N.C.; Prockop, D.J.; Horwitz, E.M.; Gregory, C.A. A potential role for DKK-1 in the pathogenesis of osteosarcoma predicts novel diagnostic and treatment strategies. *Br. J. Cancer* **2007**, *97*, 1552–1559.
47. Hall, C.L.; Kang, S.; MacDougald, O.A.; Keller, E.T. Role of Wnts in prostate cancer bone metastases. *J. Cell Biochem.* **2006**, *97*, 661–672.
48. Hall, C.L.; Daignault, S.D.; Shah, R.B.; Pienta, K.J.; Keller, E.T. Dickkopf-1 expression increases early in prostate cancer development and decreases during progression from primary tumour to metastasis. *Prostate* **2008**, *68*, 1396–1404.
49. Thudi, N.K.; Martin, C.K.; Murahari, S.; Shu, S.T.; Lanigan, L.G.; Werbeck, J.L.; Keller, E.T.; McCauley, L.K.; Pinzone, J.J.; Rosol, T.J. Dickkopf-1 (DKK-1) stimulated prostate cancer growth and metastasis and inhibited bone formation in osteoblastic bone metastases. *Prostate* **2011**, *71*, 615–625.
50. Rachner, T.D.; Thiele, S.; Gobel, A.; Browne, A.; Fuessel, S.; Erdmann, K.; Wirth, M.P.; Frohner, M.; Todenhofer, T.; Muders, M.H.; et al. High serum levels of Dickkopf-1 are associated with a poor prognosis in prostate cancer patients. *BMC Cancer* **2014**, *14*, 649.
51. Xu, W.H.; Liu, Z.B.; Yang, C.; Qin, W.; Shao, Z.M. Expression of Dickkopf-1 and beta-catenin related to the prognosis of breast cancer patients with triple negative phenotype. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e37624.
52. Yu, B.; Yang, X.; Xu, Y.; Yao, G.; Shu, H.; Lin, B.; Hood, L.; Wang, H.; Yang, S.; Gu, J.; et al. Elevated expression of DKK1 is associated with cytoplasmic/nuclear beta-catenin

- accumulation and poor prognosis in hepatocellular carcinomas. *J. Hepatol.* **2009**, *50*, 948–957.
53. Yang, H.; Chen, G.D.; Fang, F.; Liu, Z.; Lau, S.H.; Zhang, J.F.; Lau, W.Y.; Yang, L.Y. Dickkopf-1: As a diagnostic and prognostic serum marker for early hepatocellular carcinoma. *Int. J. Biol. Markers* **2013**, *28*, 286–297.
  54. Yamabuki, T.; Takano, A.; Hayama, S.; Ishikawa, N.; Kato, T.; Miyamoto, M.; Ito, T.; Ito, H.; Miyagi, Y.; Nakayama, H.; et al. Dickkopf-1 as a novel serological and prognostic biomarker for lung and esophageal carcinomas. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 2517–2525.
  55. Tung, E.K.; Mak, C.K.; Fatima, S.; Lo, R.C.; Zhao, H.; Zhang, C.; Dai, H.; Poon, R.T.; Yuen, M.F.; Lai, C.L.; et al. Clinicopathological and prognostic significance of serum and tissue dickkopf-1 levels in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* **2011**, *31*, 1494–1504.
  56. Shen, C.H.; Hsieh, H.Y.; Wang, Y.H.; Chen, S.Y.; Tung, C.L.; Wu, J.D.; Lin, C.T.; Chan, M.W.; Hsu, C.D.; Chang, D. High Dickkopf-1 expression is associated with poor prognosis in patients with advanced urothelial carcinoma. *Exp. Ther. Med.* **2010**, *1*, 893–898.
  57. Dong, L.L.; Qu, L.Y.; Chu, L.Y.; Zhang, X.H.; Liu, Y.H. Serum level of DKK-1 and its prognostic potential in non-small cell lung cancer. *Diagn. Pathol.* **2014**, *9*, 52.
  58. Jiang, T.; Huang, L.; Zhang, S. DKK-1 in serum as a clinical and prognostic factor in patients with cervical cancer. *Int. J. Biol. Markers* **2013**, *28*, 221–225.
  59. Jiang, T.; Wang, S.; Huang, L.; Zhang, S. Clinical significance of serum DKK-1 in patients with gynaecological cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* **2009**, *19*, 1177–1181.
  60. Sun, D.K.; Wang, L.; Wang, J.M.; Zhang, P. Serum Dickkopf-1 levels as a clinical and prognostic factor in patients with bladder cancer. *Genet. Mol. Res.* **2015**, *14*, 18181–18187.
  61. Zhou, S.J.; Zhuo, S.R.; Yang, X.Q.; Qin, C.X.; Wang, Z.L. Serum Dickkopf-1 expression level positively correlates with a poor prognosis in breast cancer. *Diagn. Pathol.* **2014**, *9*, 161.
  62. Bejenik, H.; Kemik, A.S.; Emre, H.; Dulger, A.C.; Demirkiran, D.; Ebinc, S.; Kemik, O. The association between serum Dickkopf-1 levels and esophageal squamous cell carcinoma. *Hum. Exp. Toxicol.* **2014**, *33*, 785–788.
  63. Shi, Y.; Gong, H.L.; Zhou, L.; Tian, J.; Wang, Y. Dickkopf-1 is a novel prognostic biomarker for laryngeal squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol.* **2014**, *134*, 753–759.
  64. Wirths, O.; Waha, A.; Weggen, S.; Schirmacher, P.; Kuhne, T.; Goodyer, C.G.; Albrecht, S.; Von Schweinitz, D.; Pietsch, T. Overexpression of human dickkopf-1, an antagonist of wntless/Wnt signalling, in human hepatoblastomas and wilms' tumors. *Lab Investig.* **2003**, *83*, 429–434.
  65. Peng, Y.H.; Xu, Y.W.; Guo, H.; Huang, L.S.; Tan, H.Z.; Hong, C.Q.; Li, S.S.; Xu, L.Y.; Li, E.M. Combined detection of serum Dickkopf-1 and its autoantibodies to diagnose esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Med.* **2016**, doi:10.1002/cam4.702.
  66. Sato, N.; Yamabuki, T.; Takano, A.; Koinuma, J.; Aragaki, M.; Masuda, K.; Ishikawa, N.; Kohno, N.; Ito, H.; Miyamoto, M.; et al. Wnt inhibitor Dickkopf-1 as a target for passive cancer immunotherapy. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 5326–5336.



67. Shen, Q.; Fan, J.; Yang, X.R.; Tan, Y.; Zhao, W.; Xu, Y.; Wang, N.; Niu, Y.; Wu, Z.; Zhou, J.; et al. Serum dkk1 as a protein biomarker for the diagnosis of hepatocellular carcinoma: A large-scale, multicentre study. *Lancet Oncol.* **2012**, *13*, 817–826.
68. Jang, E.S.; Jeong, S.H.; Kim, J.W.; Choi, Y.S.; Leissner, P.; Brechot, C. Diagnostic performance of alpha-fetoprotein, protein induced by vitamin K absence, osteopontin, Dickkopf-1 and its combinations for hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0151069.
69. Aguilera, O.; Fraga, M.F.; Ballestar, E.; Paz, M.F.; Herranz, M.; Espada, J.; Garcia, J.M.; Munoz, A.; Esteller, M.; Gonzalez-Sancho, J.M. Epigenetic inactivation of the wnt antagonist Dickkopf-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer. *Oncogene* **2006**, *25*, 4116–4121.
70. Aguilera, O.; Gonzalez-Sancho, J.M.; Zazo, S.; Rincon, R.; Fernandez, A.F.; Tapia, O.; Canals, F.; Morte, B.; Calvanese, V.; Orgaz, J.L.; et al. Nuclear Dickkopf-1 as a biomarker of chemoresistance and poor clinical outcome in colorectal cancer. *Oncotarget* **2015**, *6*, 5903–5917.
71. Krause, U.; Ryan, D.M.; Clough, B.H.; Gregory, C.A. An unexpected role for a wnt-inhibitor: Dickkopf-1 triggers a novel cancer survival mechanism through modulation of aldehyde-dehydrogenase-1 activity. *Cell Death Dis.* **2014**, *5*, e1093.
72. Gurluler, E.; Tumay, L.V.; Guner, O.S.; Kucukmetin, N.T.; Hizli, B.; Zorluoglu, A. The role of preoperative serum levels for Dickkopf-related protein 1 as a potential marker of tumour invasion in patients with stage II and III colon cancer. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2014**, *18*, 1742–1747.
73. Liu, Q.R.; Li, Y.F.; Deng, Z.Q.; Cao, J.Q. Prognostic significance of Dickkopf-1 in gastric cancer survival: A meta-analysis. *Genet. Test. Mol. Biomarkers* **2016**, *20*, 170–175.

**Chapitre 3 : Deletion of the Fanconi Anemia C Gene in Mice Leads to Skeletal Anomalies, Defective Bone Mineralisation and Microarchitecture**

## **Deletion of the Fanconi Anemia C Gene in Mice Leads to Skeletal Anomalies, Defective Bone Mineralisation and Microarchitecture**

Melody Mazon<sup>1</sup>, Jacinthe Julien<sup>1</sup>, Roth-Visal Ung<sup>1</sup>, Sylvain Picard<sup>1</sup>, Dounia Hamoudi<sup>1</sup>, Jérôme Frenette<sup>1,2</sup>, Fabrice Mac-Way<sup>1,3,\*\*</sup>, Madeleine Carreau<sup>1,4,\*</sup>

1. CHU de Québec Research Center, Québec, QC, Canada

2. Department of Réadaptation, Faculty of Medicine, Université Laval

3. Division of Nephrology, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Université Laval,

4. Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Université Laval, Québec, QC, Canada

\* Correspondence: [madeleine.carreau@crchul.ulaval.ca](mailto:madeleine.carreau@crchul.ulaval.ca); Tel.: +1-418-525-4444 (ext. 47828)

\*\* Co-corresponding author: [fabrice.mac-way@mail.chuq.qc.ca](mailto:fabrice.mac-way@mail.chuq.qc.ca); Tel : +1-418-525-4444

### 3.1. Résumé

L'anémie de Fanconi (AF) est une maladie génétique rare associée à un déclin progressif des cellules souches hématopoïétiques et à des défauts développementaux du système squelettiques. Le mécanisme sous-jacent menant aux défauts osseux est à ce jour encore inconnu. Dans cette étude, nous avons évalué la formation osseuse au cours de l'embryogenèse ainsi que la physiologie osseuse chez des souris adultes déficientes en protéines FANCC et FANCA. Nous avons constaté un retard de minéralisation chez les embryons *FancC*<sup>-/-</sup> et *FancA*<sup>-/-</sup>. À l'âge adulte, les souris *FancC*<sup>-/-</sup> présentent une diminution de la densité minérale osseuse. En utilisant des études in vitro, nous avons démontré que les cellules souches mésenchymateuses *FancC*<sup>-/-</sup> et *FancA*<sup>-/-</sup> (BM-CSM) ont une capacité de différenciation ostéoblastique réduite et un profil d'expression génique altéré. Nos résultats suggèrent que la physiologie osseuse défectueuse dans l'AF survient in utero suite à l'altération de la fonction des BM-CSM.

### 3.2. Abstract

Fanconi anemia (FA) is a rare genetic disorder associated with a progressive decline in hematopoietic stem cells leading to bone marrow failure. FA is also characterized by a variety of developmental defects including short stature and skeletal malformations. More than half of children affected with FA have radial-ray abnormalities and many patients have early onset osteopenia/osteoporosis. Although many Fanconi anemia genes have been identified and a molecular pathway defined, the underlying mechanism leading to bone defects remains elusive. To understand the role of FancC in skeletal development and bone microarchitecture, we evaluated bone physiology during embryogenesis and in adult *FancC* deficient mice. We found that *FancC*<sup>-/-</sup> embryos have abnormal skeletal development shown by skeletal malformations, growth delay and reduced bone mineralization. *FancC*<sup>-/-</sup> adult mice present altered bone morphology and microarchitecture with a significant decrease in cortical bone mineral density in a gender specific manner. Mechanical testing revealed that male but not female *FancC*<sup>-/-</sup> mice show reduced bone strength compared to their wild-type littermates. *Ex vivo* cultures showed that *FancC*<sup>-/-</sup> bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSC) have impaired osteoblastic differentiation capabilities together with altered gene expression profiles. Our results suggest that defective bone physiology in FA occurs *in utero* and possibly results from altered BMSC function. These results provide valuable insights into the mechanism involved in FA skeletal defects.

### 3.3. Introduction

Fanconi anemia (FA) is a rare genetic disease associated with a progressive failure of the bone marrow, susceptibility to malignancies and multiple congenital malformations<sup>1-4</sup>. Congenital anomalies found in patients with FA can vary from skin pigmentation changes to developmental defects of various organs including the central nervous system, gastrointestinal system and reproductive system. In addition, skeletal anomalies are frequent and some are considered characteristic of FA such as absence or duplication of digits and radial ray abnormalities. Patients with FA also have abnormal growth parameters, low birth weight and short stature<sup>5</sup>. It has been suggested that patients with FA present low bone mineral density (BMD), however, some studies argue that when adjusted for heights, patients with FA have normal BMD<sup>6</sup>. Despite height-adjustment, most studies agree that patients with FA present reduced BMD scores following bone marrow or hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) procedures<sup>7-10</sup>. Furthermore, many patients with FA were shown to have early onset osteopenia or osteoporosis; they may thus be more at risk of fractures than the general population and more dramatically so after HSCT<sup>6,11,12</sup>. Several risk factors associated with bone loss are prevalent in patients with FA and include endocrine and pituitary abnormalities, hypogonadism and prolonged glucocorticoid therapy<sup>11,13,14</sup>. However, mechanisms leading to skeletal defects in patients with FA remain elusive.

Several genes and pathways associated with bone fragility diseases have been identified<sup>15</sup>. Included in those are genes related to the Wnt pathway. Mutations and polymorphisms in Wnt pathway genes have been associated with bone diseases or linked to altered bone mineral density and abnormal bone development<sup>16</sup>. In fact, many components of the Wnt pathway are essential for bone formation and are involved in osteoblast lineage development. For instance, the Wnt pathway antagonist Dickkopf-1 (DKK1) has been described as a negative regulator of bone mass, diminishing bone formation and enhancing bone erosion<sup>17-20</sup>. DKK-1 as a part of the Dickkopf family of proteins, acts as a Wnt signal antagonist by directly binding to the Wnt co-receptor, lipoprotein receptor-related proteins 5 and 6 (LRP5/6), and to the Kremen receptor preventing activation of a Wnt signal cascade<sup>21-23</sup>. Altered expression of Dkk1 in mouse and chicken embryos cause severe developmental deficits including limb dysmorphogenesis<sup>24-26</sup>. Increased DKK1 expression was found to be associated with lytic bone diseases in patients with multiple myeloma<sup>27</sup>. In addition, serum DKK1 levels were found to correlate with BMD

parameters in patients with osteoporosis<sup>28</sup>. Interestingly, we previously reported DKK1 overproduction in FA deficient cells and mouse models of FA<sup>29</sup>.

Given the high prevalence of osteoporosis and osteopenia in patients with FA and the recognized role of DKK1 in inducing bone loss, we sought out to determine the mechanism leading to bone defects in FA and whether DKK1 is involved. To achieve this, we made use of the *FancC* deletion mouse model of FA. We show that *FancC*<sup>-/-</sup> mice present defective bone development and mineralization during embryogenesis. We also demonstrate that *FancC*<sup>-/-</sup> mice present sex-specific differences in bone properties, together with altered expression profiles of bone differentiation-specific genes. Altered bone physiology in FA is associated with defective bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (BMSC) differentiation properties that correlate with increased *Dkk1* expression.

### 3.4. Materials and Methods

#### Animals

*FancC* and *FancA* (*FancA*<sup>tm1.1Hsc</sup>) knockout mice used were described previously<sup>30,31</sup> and have been backcrossed into C57Bl/6J background (10<sup>th</sup> generation). Mice were housed in a SPF Elite facility without any pathogens with access to mouse chow and water ad libitum. Genotyping was performed by PCR as described before<sup>30,31</sup>. Twelve weeks-old mice that were the subject of bone histomorphometry received two intra-peritoneal (i.p.) injections of tetracycline (50 mg/kg; Millipore-Sigma, Etobicoke, ON, Canada) 7 days apart. Embryos were harvested by caesarean section at embryonic days 15.5, 16.5, 17.5 and 18.5. Throughout the study, wild-type littermates were used as controls. All animal experiments were approved by the Animal Care Committee of Laval University under the guidelines of the Canadian Council on Animal Care in science.

#### Bone microarchitecture and histomorphometry

Cortical bone microarchitecture assessment was performed by micro-computed tomography (micro-CT) scans of tibiae bone (eXplore Locus, GE Healthcare Canada) at a resolution of 27 µm. Image analysis allowed the evaluation of the bone cortical volume, area, mineral density, mineral content, thickness, inner and outer perimeter using an automatic bone analysis software

(eXplore Micro-View from GE Healthcare, Canada). For histomorphometry analysis, tibias were fixed in 70% ethanol, dehydrated in acetone and embedded in pure methyl methacrylate at low temperature as described in <sup>32</sup>. For histomorphometry, four non-serial 5 µm thick sections were cut on each tibia using a Microm-355S microtome (Rankin biomedical Corporation, MI, USA). The sections remained unstained or stained with modified Goldner's trichrome for measurement of dynamic and static parameters respectively using a semi-automated image analysis system (Bioquant Meg IV System; R & M Biometrics, TE, USA) and a SummaSketch II (Summagraphics, Austin, TX, USA) digitizing tablet in conjunction with an Olympus BX45 microscope (Olympus, Richmond Hill, ON, Canada) and Infinity 2-2C CCD color camera (Lumenera Corporation, Ottawa, ON, Canada). All results were derived from two-dimensional primary measurements (tissue volume or area, bone volume or area and bone surface) performed in the secondary spongiosa. All the abbreviations used are as proposed by the ASBMR histomorphometry nomenclature committee <sup>33,34</sup>.

### **Three-point binding test**

Bone mechanical properties were assessed with a three-point binding test using a MTS Bionix® Servohydraulic test system according to the manufacturers' information. Femurs collected from 12 weeks-old mice were immersed in PBS, stored at -80°C before analysis. Thawed femurs were loaded unto lower supports. Distance between loading supports was constant at 1 cm and loads were applied to the midpoint of each femur at a rate of 2 mm/min until failure. Stiffness, ultimate load, yield load and total work to failure were quantified for each femur.

### **Skeletal staining**

Whole-body skeletal staining of embryos was performed using Alizarin red and Alcian blue dyes. Embryos were scalded, skinned, eviscerated and fixed for one week in 95% ethanol followed by staining in Alcian blue solution (0.01% Alcian blue (w/v; Millipore-Sigma); 80% absolute ethanol (v/v); 20% glacial acetic acid (v/v)) for three days. Embryos were gradually rehydrated, soft tissue discarded with KOH (1 %) for 1 to 2 days, until clear appearance of skeleton and transferred in Alizarin red solution (0.001% Alizarin red (w/v; Millipore-Sigma) for up to three days. Progressive substitution of water to glycerol was performed and pictures were taken using a Nikon D810 camera equipped with medical lens and flash ring (Nikon Canada, Mississauga, ON, Canada). The lengths of the bones were measured as pixel using ImageJ software (National



Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) and converted in millimeters based on rulers present on each picture.

### **Bone marrow mesenchymal cell culture and differentiation assay**

Bone marrow cells were harvested by flushing femurs and tibias in sterile PBS with 2% SVF. Red blood cells were lysed in ammonium chloride buffer. Cells were counted and plated at a density of 1 million cells per cm<sup>2</sup> in Myelocult media (MyeloCult™ M5300, StemCell Technologies, Vancouver Canada) supplemented with 10<sup>-6</sup> M hydrocortisone, (StemCell Technologies) and antibiotics (HyClone™ Penicillin-Streptomycin 100X solution; GE Healthcare Life Sciences, Mississauga, ON, Canada). Cells were incubated for 3 hours at 33°C for adherent cells followed by a wash with PBS to remove non-adherent cells. Adherent cells were maintained at 33°C for 14 days for colony-formation assays (CFU-F) assays, or up to confluency to obtain stromal cells (4 weeks). Stromal cells were either used for gene expression analysis or tested for differentiation abilities. For CFU-F analysis, cells were stained with 0.01% crystal violet (Millipore-Sigma). For stromal cell differentiation capabilities, confluent stromal cells were trypsinized and seeded in 8-well chamber slides (ThermoFisher Scientific, Burlington, ON, Canada) at a density of 2 X 10<sup>5</sup> and 1,65 X 10<sup>5</sup> cells per cm<sup>2</sup> of culture surface area for adipogenic and osteogenic differentiation, respectively. Cells were incubated in StemXVivo Osteogenic/Adipogenic Base Media (R&S Systems, Minneapolis, MN, USA) supplemented with either osteogenic or adipogenic inducing media (R&D Systems) and cultured for 21 days with weekly media changes. Control stromal cells were incubated with base media only. For adipogenic differentiation potential, stromal and differentiated cells were fixed in 4% PFA and stained with Red oil solution (Millipore-Sigma). For osteogenic potential, cells were fixed in 4% PFA, permeabilized with 0.3% Triton X-100, 1% BSA and labeled with goat-raised anti-osteopontin followed with secondary antibodies (donkey anti-goat Alexafluor-488; ThermoFisher Scientific). Cell nuclei were labelled with DAPI (Molecular Probes). Images were obtained with Axio Imager 2 microscope, AxioCam ICc3 camera and Zen software (Zeiss) or with a Nikon D810 camera equipped with medical lens and flash ring. Positive cells were counted manually in a blind fashion. For osteogenic evaluation, 50 cells were counter per image at 6 images per mouse.

### **RNA isolation and Real-time quantitative PCR (qPCR)**

Total RNA was extracted from total bone marrow cells, adherent or stromal cells with Trizol<sup>®</sup> Reagent (ThermoFisher Scientific, Burlington, ON, Canada) according to manufacturer's instructions and resuspended in PCR grade water. For gene expression profiles in bone, femurs were kept at -80°C until RNA extraction. The epiphyses were removed and the bone was placed in Trizol<sup>®</sup> reagent. After the marrow was flushed out by centrifugation, the bones were crushed using a Precellys 24 homogenizer equipped with a Cryolys cooler (Bertin technologies, Montigny-Le-Bretonneux, France). RNA quality was assessed using the Infinite M200 PRO NanoQuant absorbance microplate reader (TECAN, Chapel Hill, NC, USA). RT and qPCR were performed using the All-In-One RT MasterMix and BrightGreen qPCR MasterMix-No Dye respectively (ABMgood, Richmond, BC, Canada) according to manufacturer's instructions and monitored in real time with a LightCycler System (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Primer pairs are summarized in Supporting Table 1. Reference genes were selected according to the NormFinder software and targeted genes were normalized to the geometric mean of reference genes. Relative expression was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method.

### **Statistical analysis**

Unless otherwise mentioned, all data is presented as means  $\pm$  SD. A minimum of four mice were used for each experiment. Column statistical analysis was performed to determine the distribution of each population and subsequent test was chosen regarding this characteristic. For smaller numbers of biological replicates, non-parametric tests were performed. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software (version 5.03) using one-way ANOVA or 2-tailed Student's t-tests as appropriate. P values less than 0.05 were considered significant.

## **3.5. Results**

### **Skeletal malformation, growth retardation and bone mineralization delay in *FancC*<sup>+/-</sup> embryos**

To evaluate the skeletal development of *Fanc*-deficient mice, *FancC*<sup>+/-</sup> and *FancA*<sup>+/-</sup> heterozygous female mice were crossed with their male counterparts to obtain embryos at different gestational stages. Embryos from gestational stages E15.5 to 18.5 were collected from *FancC*<sup>+/-</sup> and *FancA*<sup>+/-</sup> pregnant female mice by cesarean section. Genotypes of these embryos revealed a Mendelian distribution of 25.7 % homozygous *FancC* out of 105 embryos tested and

25.1 % homozygous *FancA* out of 139 embryos of all embryonic stages tested (Table 3.1). Surprisingly, the number of *FancC*<sup>-/-</sup> and *FancA*<sup>-/-</sup> mice obtained at the various gestational stages were higher than the numbers of homozygous newborn mice previously reported by others and us<sup>35,36</sup>. These results suggest that death in both *FancA*<sup>-/-</sup> and *FancC*<sup>-/-</sup> mice may occur at parturition or within a few hours after birth. This would also explain the non-Mendelian distribution reported for FA mice and suggest that FA mouse phenotypes reported in the literature is biased towards less affected mice that survive after birth. Of note, the majority of *FancA*<sup>+/-</sup> and *FancC*<sup>+/-</sup> gestational mice were also carrying up to three dead or malformed embryos per litters of unknown genotypes (9 to 12%).

Skeletal development of *FancC*<sup>-/-</sup> and *FancA*<sup>-/-</sup> embryos was analyzed at embryonic day 15.5, 16.5, 17.5 and 18.5 using a standard Alcian Blue (for cartilaginous matrice) and Alizarin Red (for mineralized cartilaginous and bony matrices) double staining method. Numerous skeletal malformations were observed in *FancC*<sup>-/-</sup> and *FancA*<sup>-/-</sup> embryos, mainly short stature, and craniofacial defects especially affecting the eyes. These developmental anomalies are consistent with known malformations observed in FA. Skeletal developmental analyses show that bone mineralization is initiated at E15.5 in wild-type embryos (Supporting Fig. 3.1A, D).

However, both *FancC*<sup>-/-</sup> and *FancA*<sup>-/-</sup> embryos showed marked delayed bone mineralization indicated by a lack of Alizarin red staining at E16.5 in the majority of bone structures (Fig. 3.1 and Supporting Fig. 3.2).

Delayed mineralization in *FancC*<sup>-/-</sup> and *FancA*<sup>-/-</sup> embryos is maintained throughout development and up to E18.5 compared to their respective wild-type and heterozygous littermates (Fig. 3.1A-C and Supporting Fig. 3.2). The mineralization delays are observed in the majority of bones including upper head, radius, ulna, tibia, femur, phalanges and vertebrae (as indicated with an arrow, Fig. 3.1A-C and Supporting Fig. 3.1 and 3.2). Reduced Alizarin red staining of the upper head suggest delayed craniofacial bone formation. At E17.5, no ossification of the phalanges is detected in *FancC*<sup>-/-</sup> and *FancA*<sup>-/-</sup> embryos compared to wild-type and heterozygous mice but is detected at E18.5 (Fig. 3.1B-C). Similarly, delayed mineralization of *FancC*<sup>-/-</sup> and *FancA*<sup>-/-</sup> vertebrae is observed at 17.5 compared to their wild-type and heterozygous littermates. These results indicate that FA-deficient embryos present delayed bone mineralization during development. This bone mineralization delay is associated with a significant reduction in bone length as shown by reduced ulnae and tibiae lengths and mineralization area in FA-deficient embryos compared to wild-type littermates (Fig. 3.1D-F and

Supporting Fig. 3.2D-F). Differences in ulnae and tibiae lengths and mineralization are less pronounced at E18.5 for *FancC*<sup>-/-</sup> but not *FancA*<sup>-/-</sup> embryos compared to wild-type littermates (Fig. 3.1F and Supporting Fig. 3.2F, respectively) suggesting a possible FA-gene effect.

Overall, these results suggest that skeletal growth and bone mineralization in FA-deficient mice is affected during embryonic development and occurs in different types of bones including long, flat and irregular bones. Our results also indicate that FA knockout mice present skeletal anomalies similar to those seen in patients with FA.

### **Defective bone structure in *FancC*<sup>-/-</sup> deficient mice**

To determine whether impaired bone defects during development is reflected in adulthood, we performed micro-CT and histomorphometric analyses of tibiae bone from both male and female *FancC*<sup>-/-</sup> and *FancA*<sup>-/-</sup> mice at 12 weeks of age. Although non-significantly different, micro-CT analyses of the tibiae cortical bone revealed that *FancC*<sup>-/-</sup> mice, both males and females, show reduced marrow and cortical bone area (Fig. 3.2A-B). The observed reduction in bone area between *FancC*<sup>-/-</sup> and wild-type mice is not statistically different because *FancC*<sup>-/-</sup> animals present variability in marrow, cortical and total bone area. This variability between *FancC*<sup>-/-</sup> mice reflects those observed in patients with FA. A similar, albeit less pronounced, reduction in cortical thickness and perimeter, both inner and outer perimeter, was observed in males and females *FancC*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 3.2C). Again, variability in cortical thickness is observed between *FancC*<sup>-/-</sup> animals, and more dramatically within male mice. Additionally, bone mineral density is dramatically reduced in both males and females *FancC*<sup>-/-</sup> mice compared to their wild-type littermates (Fig. 3.2D, left panel). Bone mineral content was slightly reduced in *FancC*<sup>-/-</sup> mice compared to wild-type littermates (Fig. 3.2D, right panel).

Although slightly increased, histomorphometry analyses of *FancC*<sup>-/-</sup> adult male mice did not show significant difference in mean osteoid surface, thickness and volume compared to wild-type male littermates as well as between *FancC*<sup>-/-</sup> and wild-type female mice (Fig. 3.2F). However, male *FancC*<sup>-/-</sup> mice show marked decreased trabecular bone and tissue volume compared to wild-type littermates, whereas female *FancC*<sup>-/-</sup> mice show similar bone volume and tissue area as their female wild-type littermates (Fig. 3.2G). Accordingly, *FancC*<sup>-/-</sup> male mice present increased trabecular separation, reduced trabecular number but no change in thickness (Fig. 3.2H). Similar trabecular separation, number and thickness is observed between *FancC*<sup>-/-</sup> and wild-type female mice (Fig. 3.2H). Although male *FancC*<sup>-/-</sup> mice show no significant difference in bone

mineralization parameters, female *FancC*<sup>-/-</sup> mice show a lower total mineralizing surface and significantly reduced double labeled mineralization surface compared to wild-type littermates (Fig. 3.2I). These results suggest that male and female *FancC*<sup>-/-</sup> mice present defects in bone microarchitecture and mineralization in a gender-specific manner. Intra-uterine bone developmental defects seem therefore to impact bone structure in adult and possibly contribute to bone fragility.

To appropriately verify the bone strength of *FancC*<sup>-/-</sup> adult mice, we next performed biomechanical testing using the three-points bending test to assess the load-bearing capacity and strength of the femurs. Although the femur length and diameters did not differ between *FancC*<sup>-/-</sup> and their wild-type littermates, *FancC*<sup>-/-</sup> male mice show dramatically reduced bone stiffness, whereas female *FancC*<sup>-/-</sup> mice show only a slight decrease in stiffness (Fig. 3.3A). In addition, the maximum load at breaking point was significantly lower in *FancC*<sup>-/-</sup> male but not female mice compared to wild-type littermates. However, the total work to failure load did not significantly differ between *FancC*<sup>-/-</sup> and wild-type mice, both males and females. These results suggest that *FancC*<sup>-/-</sup> mice have a tendency towards reduced bone strength.

Overall, *FancC*<sup>-/-</sup> mice, especially males, show subtle differences in bone morphology and microarchitecture compared to their wild-type littermates.

### **Altered gene expression in *FancC*<sup>-/-</sup> bone-derived cells**

Gene expression profiles of compact bone cells were evaluated to identify molecular mechanisms responsible for defective bone development in *FancC*<sup>-/-</sup> mice. Quantitative PCR were performed using selected bone-specific genes as targets (Supporting Table 3.1). Comparison of gene expression between *FancC*<sup>-/-</sup> and wild-type mice revealed a significant increase in expression of pro-osteoblastic genes including Runx2 and Osterix (Fig. 3.3B). Terminal markers of osteoblastic differentiation, including osteocalcin and Alkaline phosphatase were overexpressed in *FancC*<sup>-/-</sup> mice compared to wild-type littermates. Similarly, collagen genes type 1 and 2 were highly expressed in *FancC*<sup>-/-</sup> derived cells compared to those obtained from wild-type littermates. No differences in gene expression profiles were observed between male and female mice, from both *FancC*<sup>-/-</sup> and WT genotypes. Although increased Wnt pathway antagonist Dkk1 has been reported by us in plasma from *FancC*<sup>-/-</sup> mice<sup>29</sup>, no significant changes in Dkk1 expression were observed in bone-derived cells from *FancC*<sup>-/-</sup> mice compared to WT mice. In addition, we did not detect significant changes in other Wnt pathway genes including

$\beta$ -catenin or Cyclin D1 in bone-derived cells. These results suggest that bone cells from *FancC*<sup>-/-</sup> mice have defective signaling mechanisms possibly as a result of altered bone metabolism or an imbalanced bone marrow microenvironment.

### ***FancC*<sup>-/-</sup> mesenchymal stromal cells have defective differentiation abilities**

Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (<sub>BM</sub>MSC) including mesenchymal stem cells are crucial components of the bone marrow environment as they possess the potential to differentiate into bone, fat and cartilage-producing cells. Given that dysregulation in <sub>BM</sub>MSC function may affect bone development in *FancC*<sup>-/-</sup> mice, we evaluated the number of <sub>BM</sub>MSC in *FancC*<sup>-/-</sup> and *FancA*<sup>-/-</sup> bone marrow. Cytometric analysis of freshly harvested bone marrow cells shows a non-significant increase in the numbers of <sub>BM</sub>MSC present in *FancC*<sup>-/-</sup> bone marrow compared to wild-type littermates (Fig. 3.4A). However, no differences in the numbers of *FancA*<sup>-/-</sup> and wild-type derived <sub>BM</sub>MSC were observed (Supporting Fig. 3.3A). These results suggest that, while numbers of <sub>BM</sub>MSC in FA-deficient mice are similar to those found in WT littermates, they may still present altered function that could explain bone defects. Although, *FancC*<sup>-/-</sup> <sub>BM</sub>MSC showed similar fibroblast colony-forming (CFU-F) capacity compared to wild-type cells (Fig. 3.4B), they show altered osteogenic differentiation potential as seen by reduced osteopontin-positive cells and reduced Alizarin Red staining in native condition (Fig. 3.4B and data not shown). In addition, <sub>BM</sub>MSC from *FancC*<sup>-/-</sup> animals showed increased propensity to differentiate into adipocytes (Red-oil positive cells) following culture (Fig. 3.4C-D). Similar results were obtained with *FancA*<sup>-/-</sup> derived <sub>BM</sub>MSC showing dramatic increased in Red-oil positive cells following culture (Supporting Fig. 3.3B-C). These results suggest that *FancC*<sup>-/-</sup> and *FancA*<sup>-/-</sup> <sub>BM</sub>MSC have skewed differentiation abilities in favor of adipogenesis. Consequently, altered osteogenic potential found in FA-deficient <sub>BM</sub>MSC may explain abnormal bone development seen in both *FancC*<sup>-/-</sup> and *FancA*<sup>-/-</sup> mice.

Next, to determine possible molecular mechanism leading to altered <sub>BM</sub>MSC function in *FancC*<sup>-/-</sup> and *FancA*<sup>-/-</sup> mice, we used quantitative polymerase-chain reaction analysis to examine expression levels of genes involved in lineage specification as summarized in Supporting Table 1. Results show that mRNA levels of adipogenic pathway genes including the Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma (*PPAR* $\gamma$ ) and the Adiponectin C1Q And Collagen Domain Containing protein (*Adipoq*) are elevated in *FancC*<sup>-/-</sup> <sub>BM</sub>MSC compared to wild-type cells, whereas the CAAT/Enhancer Binding Protein alpha (*C/EBP* $\alpha$ ) remains unchanged (Fig. 3.4E).

In addition, genes involved in osteoblastogenesis including the Runt Related Transcription Factor 2 (*Runt2*), the Collagen type II Alpha 1 chain (*Col2a1*), the Cadherin 2 (*Cdh2*) and the Twist Family basic helix-loop-helix transcription factor 1 (*Twist1*) remain unchanged in both genotypes (Fig. 4E). Furthermore, gene expression of the transcription factor GATA-binding protein 2 (*Gata2*) involved in hematopoietic development is dramatically reduced in *FancC*<sup>-/-</sup><sub>BM</sub>MSC compared to wild-type cells. As found in bone-derived cells, we did not detect any changes in the Wnt-pathway related genes  $\beta$ -catenin and Cyclin D1 between wild-type and *FancC*<sup>-/-</sup><sub>BM</sub>MSC. However, expression of *Dkk1* was elevated in *FancC*<sup>-/-</sup><sub>BM</sub>MSC compared to WT cells supporting our previous report of elevated Dkk1 levels in plasma from *FancC*<sup>-/-</sup> mice<sup>29</sup>. Surprisingly, no change in gene expression profiles were detected in *FancA*<sup>-/-</sup><sub>BM</sub>MSC compared to wild-type cells (Supporting Fig. 3.3D).

Together, these results indicate that *FancC* deletion in <sub>BM</sub>MSC alters the expression profile of genes involved in adipogenic function and support data showing skewed differentiation potential of *FancC*<sup>-/-</sup><sub>BM</sub>MSC towards adipogenesis.

### 3.6. Discussion

In this study, we present evidence that FA proteins, notably FancA and FancC, are necessary for efficient skeletal development during embryogenesis. Our results show that FA mouse models, at least *FancA* and *FancC*, share phenotypic similarities with patients affected by FA. These are growth delay, microcephaly, reduced bone length and various skeletal alterations. FA mouse models have been generated for the majority of FA genes, and in most cases, have failed to show overt phenotypic abnormalities<sup>36</sup>. Our work shows developmental abnormalities in both *FancA*<sup>-/-</sup> and *FancC*<sup>-/-</sup> mice at all gestational stages studied. Surprisingly, we observed a Mendelian distribution of wild-type, heterozygous and homozygous embryos at all gestational stages, which is not reflected at birth<sup>30,31,35,36</sup>. We also observed that average gestational litter sizes were larger than numbers of mice obtained at weaning. These results imply that neonatal death, death immediately at birth or cannibalization by the mother occur for *FancA* and *FancC* homozygous mice. As such, FA-deficient mice that survive past the weaning period would have fewer apparent or less severe developmental abnormalities. In fact, our results suggest that *FancA* and *FancC* knockout mice phenocopy congenital abnormalities observed in patients with FA more accurately and that of previous reports. Given that neonatal deaths caused by subtle defects

of various organs have been reported for many single gene mouse mutants<sup>37</sup>, a more in-depth analysis of FA-deficient embryos and mice at birth may reveal other developmental defects similar to those found in patients with FA.

Several skeletal defects characteristic of FA have been described but few studies have looked at bone metabolism and structure. Patients with FA were shown to have low BMD, more so following hematopoietic stem cell transplantation<sup>8,12</sup>. Given their short stature, some argue that correction for height-age is required for patients with FA, which eliminates the prevalence of low BMD<sup>6,12</sup>. Various factors may also contribute to differences between studies with patients affected by FA including age, treatments and hypogonadism, as such, using mouse models with identical genetic background would at least eliminate some of these variables. In our study, we used two different mouse models of FA, *FancA*<sup>-/-</sup> and *FancC*<sup>-/-</sup>, and found mineralization delays in all bones throughout development. In fact, FA-deficient mice showed that bone mineralization is delayed compared to wild-type and heterozygous littermates. Growth delays were also observed in 12 weeks-old adult mice as shown by lower BMD, bone marrow area, outer and inner cortical bone perimeter. *FancC*<sup>-/-</sup> mice, both males and females, showed lower scores in many trabecular bone microarchitecture parameters compared to wild-type littermates. Although these differences were not statistically significant, significance is obtained when mice from both genders are grouped (data not shown) and confirm some of the results reported for *FancC/FancG* double knockout mice<sup>38</sup>. However, we chose to present our data based on gender to highlight sex-specific differences on bone structural and physical properties. In fact, *FancC*<sup>-/-</sup> female mice showed reduced bone mineralization (double labeled surface and tendency to lower total mineralization surface) compared to wild-type littermates but similar bone mechanical properties, whereas *FancC*<sup>-/-</sup> male mice showed significantly reduced mechanical properties (stiffness and maximum load capacities) of femurs compared to wild-type littermates. These findings imply that male patients with FA could be more at risk of fracture than females. Our findings clearly suggest that the mineralization and growth defects observed in young mice are responsible for abnormal bone microarchitecture in adult mice and possibly leads to decreased bone strength.

Our study shows that *FancC*<sup>-/-</sup>-derived bone cells present altered expression of genes involved in bone metabolism. The osteoblast-specific transcription factors *Runx2* was found overexpressed in *FancC*<sup>-/-</sup>-derived bone cells compared to wild-type cells. We also found overexpression of the morphogen *Bmp2* in *FancC*<sup>-/-</sup>-derived bone cells. BMP2 is known to



activate transcription of *Runx2* through Smad signaling, which activates transcription of downstream regulators of osteoblast differentiation and bone formation<sup>39</sup>. Indeed, we found that *FancC*<sup>-/-</sup> bone cells overexpressed *Osteocalcin* along with other bone related genes, notably, *Osterix* and *Alkaline phosphatase*. Given that *Runx2* needs to be downregulated for bone cell maturation<sup>40,41</sup>, its overexpression may explain mineralization delays observed in FA mice. Overexpression of osteoblast-specific genes in bone-derived cells may also reflect a counterbalance for defective bone formation. Altered gene expression in bone-derived cells may indicate defective signaling from components of the bone marrow environment, specifically bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSC). BM-MSC are responsible for bone tissue development and maintenance, they also give rise to other supporting cell types including adipocytes and chondrocytes. In FA, only a few studies looked at BM-MSC function (using different models and approaches) and showed inconsistent and contradictory results<sup>42-44</sup>. Some of these studies agreed that FA-derived BM-MSC exhibit cellular deficits including increased senescence and reduced proliferation, while others only found subtle changes in their ability to support hematopoiesis. Our study showed that *FancC*<sup>-/-</sup> and more dramatically, *FancA*<sup>-/-</sup>-derived BM-MSC have a propensity to differentiate into adipocytes. Several studies have established a reverse relationship between adipocyte and osteoblasts differentiation of BM-MSC<sup>45,46</sup>. In fact, adipocyte-rich marrow is a feature of bone marrow aplasia and has been observed in mouse models of FA and patients with FA<sup>47,48</sup>. Our data support this view and imply that in FA, adipogenesis is a preferred route to osteogenesis. This is in part supported by a slight increase in expression of the adipogenic transcription factor *Pparγ* and the downstream effector *Adipoq* in *FancC*<sup>-/-</sup> BM-MSC. However, no change in gene expression of adipogenic factors tested were detected in *FancA*<sup>-/-</sup>-derived cells (Supporting Fig. 3.3E). These differences could be attributed to specific FA gene function. Similarly, no difference in CFU-F numbers could be detected in both our mouse models compared to those reported for *FancG*<sup>-/-42</sup>, again supporting differences between FA mouse models or to differences in cell culture and/or cell isolation and expansion methods. However, we found defective hematopoietic supportive ability of BM-MSC in transplantation models (data not shown) similar to previous reports<sup>38,42</sup>, thus confirming defective function of BM-MSC. Despite differences between FA mouse models, BM-MSC-derived FA cells showed skewed differentiation towards adipogenesis. One factor shown to favor adipogenesis over osteogenesis is *Dkk1*<sup>49,50</sup>. Although we previously reported elevated levels of *Dkk1* in blood of *FancA*<sup>-/-</sup> and *FancC*<sup>-/-</sup> animals<sup>29</sup>, we failed to detect significant increase in

*Dkk1* expression in bone-derived cells from *FancC*<sup>-/-</sup> mice. Similarly, BM MSC from *FancA*<sup>-/-</sup> and *FancC*<sup>-/-</sup> mice showed a non-significant increase in *Dkk1* expression possibly reflecting a mixed population of cells. Although the origin of Dkk1 overproduction has yet to be clearly identified, overproduction of Dkk1 might be responsible for defective bone metabolism in FA. Given that Dkk1 also negatively impact hematopoiesis<sup>51</sup>, Dkk1 combined with defective bone metabolism and signaling may contribute to bone marrow failure in patients with FA.

In summary, our study demonstrates clear skeletal anomalies combined with defective bone mineralisation and formation in at least two FA-deficient mouse models, *FancA*<sup>-/-</sup> and *FancC*<sup>-/-</sup>, reflecting those observed in patients with FA.

### 3.7. Acknowledgments

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research and the Fondation du CHU de Québec to MC and Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to JF. We wish to thank Ms Jessica Filiatrault for her work with mouse embryos.

### 3.8. Disclosure statement

The authors declare having no conflicts of interest.

### 3.9. References

1. Alter BP. Diagnosis, genetics, and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007;29-39.
2. Mehta PA, Tolar J. Fanconi Anemia. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., eds. GeneReviews(R). Seattle (WA); 1993.
3. Parikh S, Bessler M. Recent insights into inherited bone marrow failure syndromes. *Curr Opin Pediatr*. 2012;24(1):23-32.
4. Alter BP, Giri N, Savage SA, Rosenberg PS. Cancer in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndrome cohort after 15 years of follow-up. *Haematologica*. 2017.
5. Wajnrajch MP, Gertner JM, Huma Z, et al. Evaluation of growth and hormonal status in patients referred to the International Fanconi Anemia Registry. *Pediatrics*. 2001;107(4):744-754.
6. Rose SR, Rutter MM, Mueller R, et al. Bone mineral density is normal in children with Fanconi anemia. *Pediatric blood & cancer*. 2011.

7. Petryk A, Bergemann TL, Polga KM, et al. Prospective study of changes in bone mineral density and turnover in children after hematopoietic cell transplantation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(3):899-905.
8. Petryk A, Polgreen LE, Barnum JL, et al. Bone Mineral Density in Children with Fanconi Anemia after Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015.
9. Buchs N, Helg C, Collao C, et al. Allogeneic bone marrow transplantation is associated with a preferential femoral neck bone loss. *Osteoporos Int.* 2001;12(10):880-886.
10. Petryk A, Polgreen LE, Zhang L, et al. Bone mineral deficits in recipients of hematopoietic cell transplantation: the impact of young age at transplant. *Bone Marrow Transplant.* 2014;49(2):258-263.
11. Giri N, Batista DL, Alter BP, Stratakis CA. Endocrine abnormalities in patients with Fanconi anemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(7):2624-2631.
12. Shankar RK, Giri N, Lodish MB, et al. Bone mineral density in patients with inherited bone marrow failure syndromes. *Pediatr Res.* 2017.
13. Petryk A, Kanakatti Shankar R, Giri N, et al. Endocrine disorders in Fanconi anemia: recommendations for screening and treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(3):803-811.
14. Rose SR, Myers KC, Rutter MM, et al. Endocrine phenotype of children and adults with Fanconi anemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2012;59(4):690-696.
15. Makitie RE, Kampe AJ, Taylan F, Makitie O. Recent Discoveries in Monogenic Disorders of Childhood Bone Fragility. *Curr Osteoporos Rep.* 2017;15(4):303-310.
16. Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med.* 2013;19(2):179-192.
17. Li J, Sarosi I, Cattley RC, et al. Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia. *Bone.* 2006;39(4):754-766.
18. Schulze J, Seitz S, Saito H, et al. Negative regulation of bone formation by the transmembrane Wnt antagonist Kremen-2. *PLoS one.* 2010;5(4):e10309.
19. Morvan F, Boulukos K, Clement-Lacroix P, et al. Deletion of a single allele of the Dkk1 gene leads to an increase in bone formation and bone mass. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2006;21(6):934-945.
20. Pinzone JJ, Hall BM, Thudi NK, et al. The role of Dickkopf-1 in bone development, homeostasis, and disease. *Blood.* 2009;113(3):517-525.
21. Niehrs C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene.* 2006;25(57):7469-7481.
22. Semenov MV, Zhang X, He X. DKK1 antagonizes Wnt signaling without promotion of LRP6 internalization and degradation. *The Journal of biological chemistry.* 2008;283(31):21427-21432.
23. Bao J, Zheng JJ, Wu D. The structural basis of DKK-mediated inhibition of Wnt/LRP signaling. *Science signaling.* 2012;5(224):pe22.
24. Grotewold L, Ruther U. Bmp, Fgf and Wnt signalling in programmed cell death and chondrogenesis during vertebrate limb development: the role of Dickkopf-1. *The International journal of developmental biology.* 2002;46(7):943-947.

25. Grotewold L, Ruther U. The Wnt antagonist Dickkopf-1 is regulated by Bmp signaling and c-Jun and modulates programmed cell death. *The EMBO journal*. 2002;21(5):966-975.
26. Mukhopadhyay M, Shtrom S, Rodriguez-Esteban C, et al. Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Developmental cell*. 2001;1(3):423-434.
27. Tian E, Zhan F, Walker R, et al. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *The New England journal of medicine*. 2003;349(26):2483-2494.
28. Butler JS, Murray DW, Hurson CJ, O'Brien J, Doran PP, O'Byrne JM. The role of Dkk1 in bone mass regulation: correlating serum Dkk1 expression with bone mineral density. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2011;29(3):414-418.
29. Huard CC, Tremblay CS, Helsper K, et al. Fanconi anemia proteins interact with CtBP1 and modulate the expression of the Wnt antagonist Dickkopf-1. *Blood*. 2013;121(10):1729-1739.
30. Chen M, Tomkins DJ, Auerbach W, et al. Inactivation of Fac in mice produces inducible chromosomal instability and reduced fertility reminiscent of Fanconi anaemia. *Nat Genet*. 1996;12(4):448-451.
31. Wong JC, Alon N, McKerlie C, Huang JR, Meyn MS, Buchwald M. Targeted disruption of exons 1 to 6 of the Fanconi Anemia group A gene leads to growth retardation, strain-specific microphthalmia, meiotic defects and primordial germ cell hypoplasia. *Hum Mol Genet*. 2003;12(16):2063-2076.
32. Chappard D, Palle S, Alexandre C, Vico L, Riffat G. Bone embedding in pure methyl methacrylate at low temperature preserves enzyme activities. *Acta Histochem*. 1987;81(2):183-190.
33. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Muller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*. 2010;25(7):1468-1486.
34. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*. 2013;28(1):2-17.
35. Carreau M. Not-so-novel phenotypes in the Fanconi anemia group D2 mouse model. *Blood*. 2004;103(6):2430.
36. Bakker ST, de Winter JP, te Riele H. Learning from a paradox: recent insights into Fanconi anaemia through studying mouse models. *Dis Model Mech*. 2013;6(1):40-47.
37. Turgeon B, Meloche S. Interpreting neonatal lethal phenotypes in mouse mutants: insights into gene function and human diseases. *Physiol Rev*. 2009;89(1):1-26.
38. Zhou Y, He Y, Xing W, et al. An abnormal bone marrow microenvironment contributes to hematopoietic dysfunction in Fanconi anemia. *Haematologica*. 2017;102(6):1017-1027.
39. Beederman M, Lamplot JD, Nan G, et al. BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation. *J Biomed Sci Eng*. 2013;6(8A):32-52.
40. Vimalraj S, Arumugam B, Miranda PJ, Selvamurugan N. Runx2: Structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation. *Int J Biol Macromol*. 2015;78:202-208.
41. Komori T. Runx2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation. *Histochem Cell Biol*. 2018.

42. Li Y, Chen S, Yuan J, et al. Mesenchymal stem/progenitor cells promote the reconstitution of exogenous hematopoietic stem cells in Fancg<sup>-/-</sup> mice in vivo. *Blood*. 2009.
43. Mantelli M, Avanzini MA, Rosti V, et al. Comprehensive characterization of mesenchymal stromal cells from patients with Fanconi anaemia. *Br J Haematol*. 2015;170(6):826-836.
44. Fernandez-Garcia M, Lamana Luzuriaga M, Hernando-Rodriguez M, Sanchez-Dominguez R, Bueren J, Yanez R. Improved hematopoietic gene therapy in a mouse model of Fanconi anemia mediated by mesenchymal stromal cells. *Hum Gene Ther*. 2017.
45. Rosen CJ, Klibanski A. Bone, fat, and body composition: evolving concepts in the pathogenesis of osteoporosis. *Am J Med*. 2009;122(5):409-414.
46. Muruganandan S, Roman AA, Sinal CJ. Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: cross talk with the osteoblastogenic program. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(2):236-253.
47. Carreau M, Gan OI, Liu L, et al. Bone marrow failure in the Fanconi anemia group C mouse model after DNA damage. *Blood*. 1998;91(8):2737-2744.
48. Naveiras O, Nardi V, Wenzel PL, Hauschka PV, Fahey F, Daley GQ. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature*. 2009;460(7252):259-263.
49. Park JR, Jung JW, Lee YS, Kang KS. The roles of Wnt antagonists Dkk1 and sFRP4 during adipogenesis of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Cell proliferation*. 2008;41(6):859-874.
50. Christodoulides C, Laudes M, Cawthorn WP, et al. The Wnt antagonist Dickkopf-1 and its receptors are coordinately regulated during early human adipogenesis. *Journal of cell science*. 2006;119(Pt 12):2613-2620.
51. Fleming HE, Janzen V, Lo Celso C, et al. Wnt signaling in the niche enforces hematopoietic stem cell quiescence and is necessary to preserve self-renewal in vivo. *Cell Stem Cell*. 2008;2(3):274-283.

### 3.10. Figures

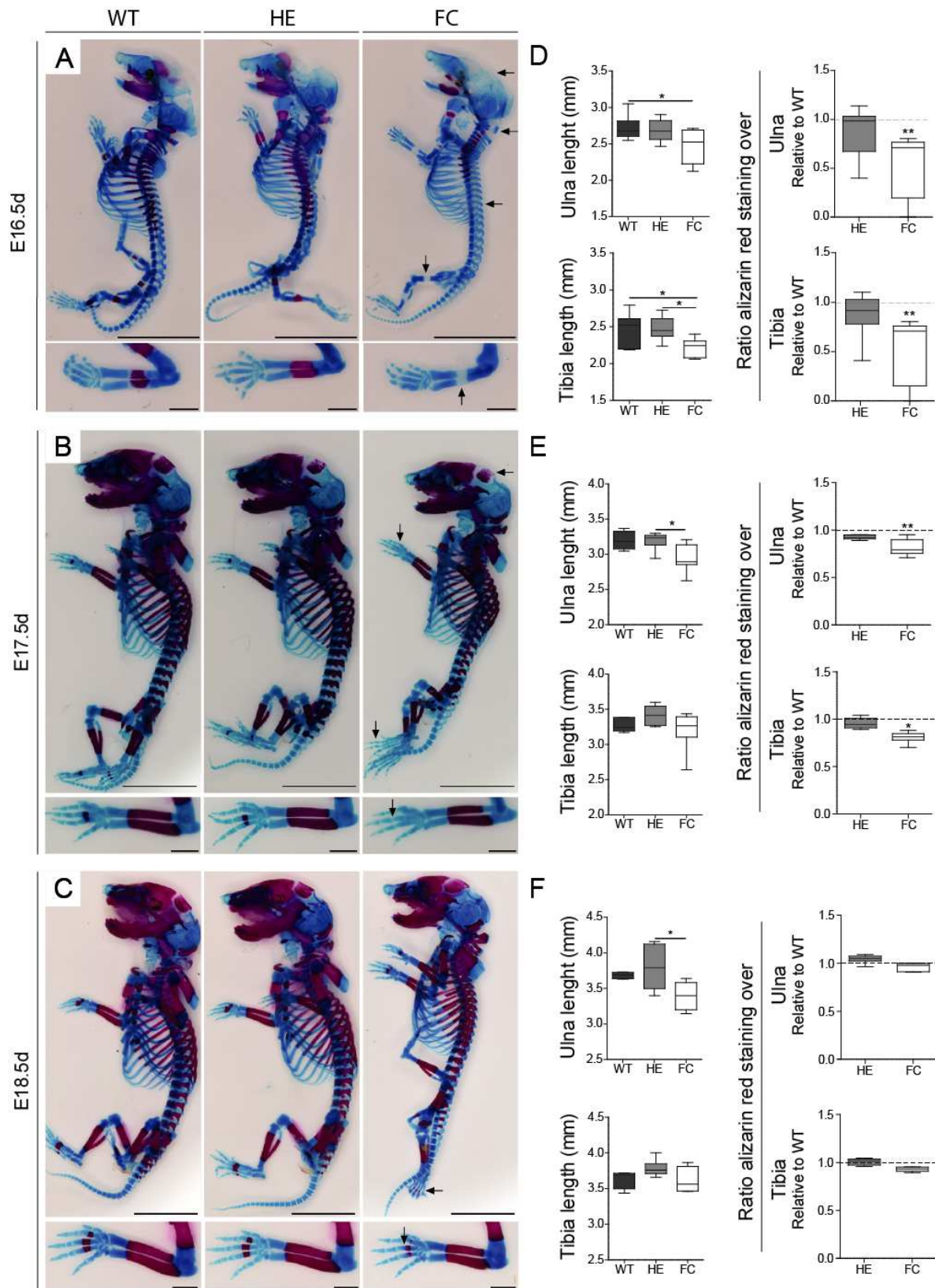


Figure 3.1 : Skeletal development of *FancC*<sup>-/-</sup> embryos.

(A-C) Representative skeletal preparations of wild-type (WT), *FancC*<sup>+/-</sup> (HE) and *FancC*<sup>-/-</sup> (FC) and littermates at embryonic day 16.5, 17.5 and 18.5 double-stained with Alcian Blue (for cartilaginous matrices) and Alizarin Red (for mineralized cartilaginous and bony matrices). Arrows in *FancC*<sup>-/-</sup> embryos indicate area without mineralization compared to WT. Lines indicate magnification (embryos: 5 mm; forearm: 1 mm). (D-F) Box and whiskers graphs showing bone lengths (left panels) and mineralization area of ulnae and tibiae (ratio of Alizarin Red staining to bone length relative to WT; right panels) at embryonic day 16.5 (D), 17.5 (E) and 18.5 (F) of *FancC*<sup>-/-</sup> (FC; n=5 to 6), *FancC*<sup>+/-</sup> (HE; n=7 to 11) and wild-type (WT; n=4 to 7) littermates.

Rapport-Gratuit.com

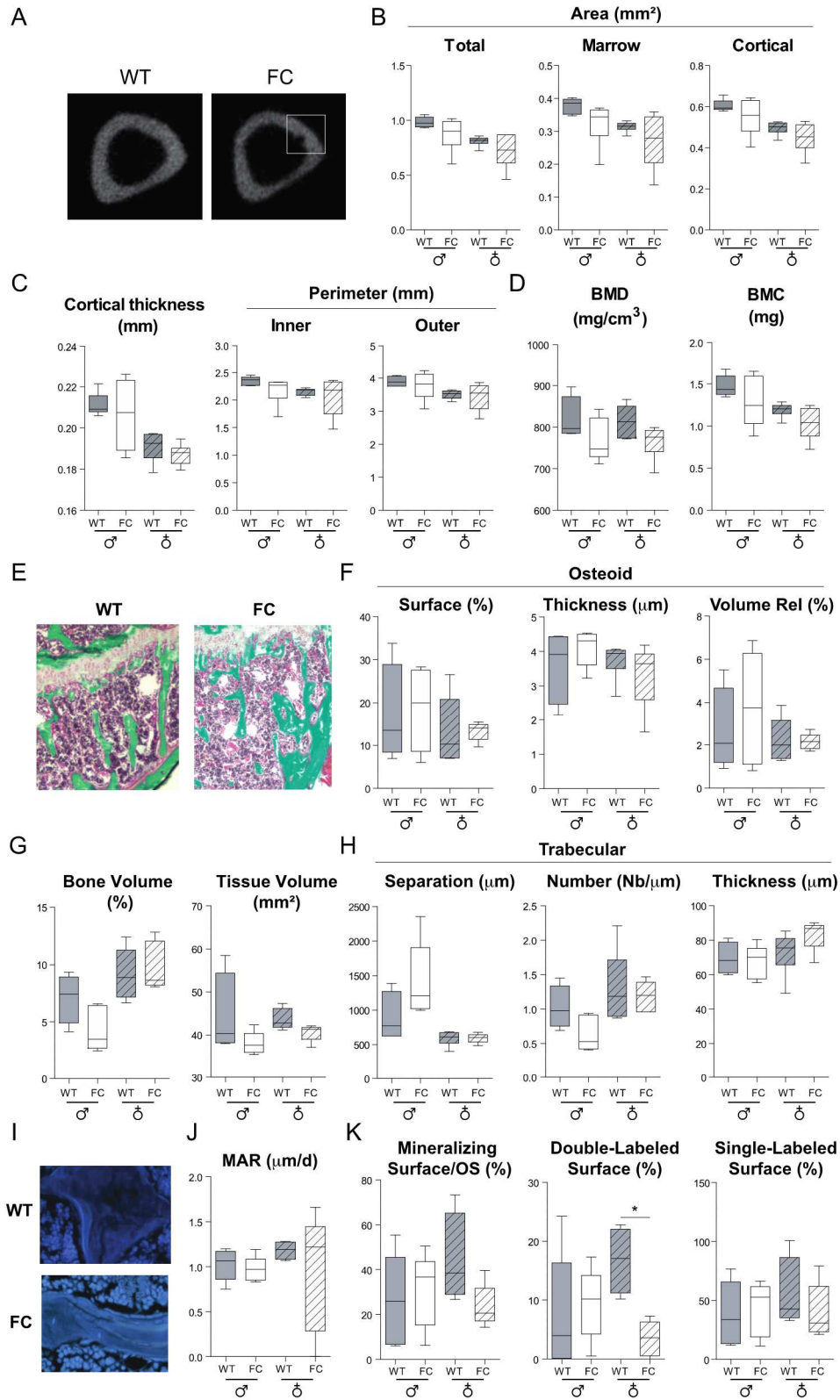


Figure 3.2 : Bone microarchitecture and histomorphometry parameters of *FancC*<sup>-/-</sup> mice.



(A) Representative micro-CT image of cross sectional tibiae of *FancC*<sup>-/-</sup> and wild-type (WT) littermates for cortical bone assessment. (B-D) Micro-CT analysis of tibiae from male (plain bars) and female (hatched bars) *FancC*<sup>-/-</sup> (6 males, 6 females) and WT (6 males, 6 females) littermates at 12 weeks of age. (B) Cortical bone marrow and bone area. (C) Cortical thickness, inner and outer perimeter. (D) BMD: Bone Mineral Density; BMC: Bone Mineral Content. (E) Representative image of Goldner's trichrome stained tibiae from WT and *FancC*<sup>-/-</sup> littermates at 12 weeks of age for histomorphometry analysis. (F-K) Quantitative histomorphometric analysis of tibias secondary spongiosa from male (plain bars) and female (hatched bars) WT (6 males, 4 females) and *FancC*<sup>-/-</sup> (5 males, 5 females) littermates at 12 weeks of age. (F) Osteoid surface, thickness and volume. (G) Bone volume and tissue volume. (H) Trabecular separation, number and thickness. (I) Representative image of bone tetracycline staining. (J-K) Mineralization apposition rate, mineralizing surface and double and single labeled of osteoid surface from WT and *FancC*<sup>-/-</sup> littermates at 12 weeks of age.



(A) Representative diagram of load-displacement from WT and *FancC*<sup>-/-</sup> male mice femurs (left panel). Three-point bending test analysis of femurs from male (plain bars) and female (hatched bars) wild-type (WT; 6 males, 9 females) and *FancC*<sup>-/-</sup> (FC; 9 males, 3 females) littermates at 12 weeks of age. (B) RT-qPCR analyses of compact bone cells from male and female wild-type (WT; 3 males, 4 females) and *FancC*<sup>-/-</sup> (FC; 4 males, 5 females) littermates at 12 weeks of age. Values relative to WT and normalized to ACTB-B2M geometric mean. Error bars represent SD. \* p<0.05, \*\*p<0.005, \*\*\*p<0.0005.

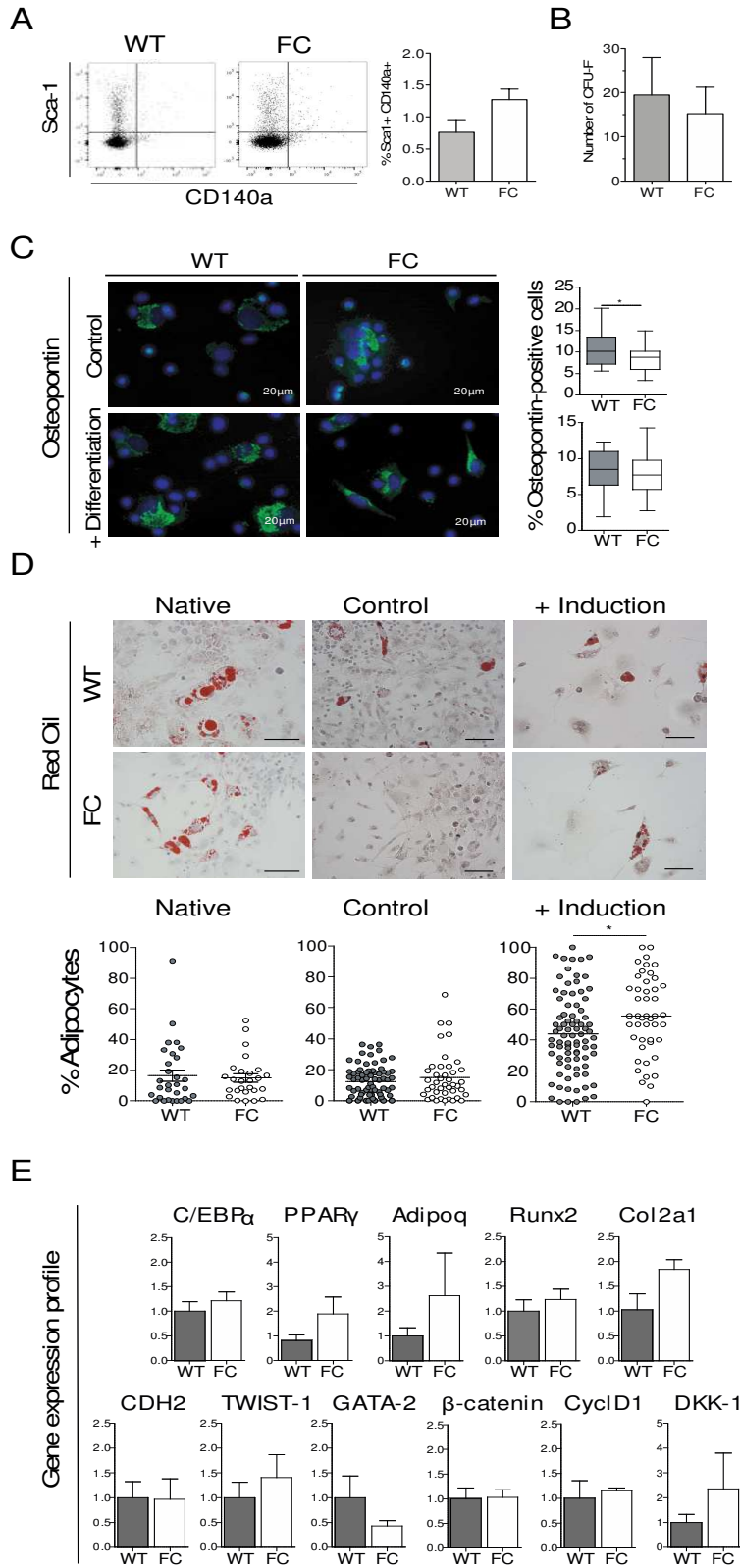


Figure 3.4 : Number, differentiation abilities and expression profile of *FancC*<sup>-/-</sup> bone marrow-derived stromal cells.

(A) Number of CD140- $\alpha^+$ /Sca-1 $^+$  population in freshly harvested  $_{BM}MSC$  from wild-type (WT; 3 males, 4 females) and *FancC* $^{-/-}$  (FC; 2 males, 1 females) mice. Bar graph representation of % Sca1 $^+$ CD140a $^+$  cells gated on viable single cells. Error bars represent SEM. (B) CFU-F quantification of  $_{BM}MSC$  from wild-type (WT; 3 males, 1 females) and *FancC* $^{-/-}$  (FC; 3 males, 2 females) mice at 12 weeks of age. Error bars represent SEM. (C) Representative image of Osteopontin-positive  $_{BM}MSC$  cells (green) cultured without (Control; upper panel) or with (+ Differentiation; lower panel) osteogenic inducing media. Nuclei were stained with DAPI. Mean percent Osteopontin-positive  $_{BM}MSC$  from wild-type (WT; 5 males, 2 females) and *FancC* $^{-/-}$  (FC; 4 males, 2 females) mice following culture without (upper graph) or with (lower graph) osteogenic inducing media. (D) Representative image of  $_{BM}MSC$  after harvest (native condition; left panel) and following culture with (induction; right panel) or without (control; middle panel) adipogenic inducing media. Scale bars = 50  $\mu m$ . Percent Red-Oil positive cells derived from wild-type (WT; 4 males) and *FancC* $^{-/-}$  (FC; 4 males, 2 females) mice. \* $p < 0.05$ . (E) RT-qPCR analyses freshly harvested  $_{BM}MSC$  from wild-type (WT; 4 males) and *FancC* $^{-/-}$  (FC; 3 males, 1 females) mice. Values relative to WT and normalized to SDHA-ACTB geomean. Error bars represent SD.

### 3.11. Tables

**Table 3.1 : Distribution of offspring from *FancC*<sup>+/-</sup> and *FancA*<sup>+/-</sup> intercrosses.**

	<b>Wild-type</b>	<b>Heterozygous</b>	<b>Homozygous</b>	<b>Total</b>
Number of embryos* from <i>FancC</i> <sup>+/-</sup> intercrosses (%)	27 (25.7)	48 (45.7)	30 (28.6)	105 (100)
Number of embryos† from <i>FancA</i> <sup>+/-</sup> intercrosses (%)	35 (25.1)	75 (54)	29 (20.9)	139 (100)

\*14 litters analyzed with an average of 8.6 embryos per *FancC*<sup>+/-</sup> gestational mouse

†18 litters analyzed with an average of 8.5 embryos per *FancA*<sup>+/-</sup> gestational mouse

### 3.12. Supplementary Data

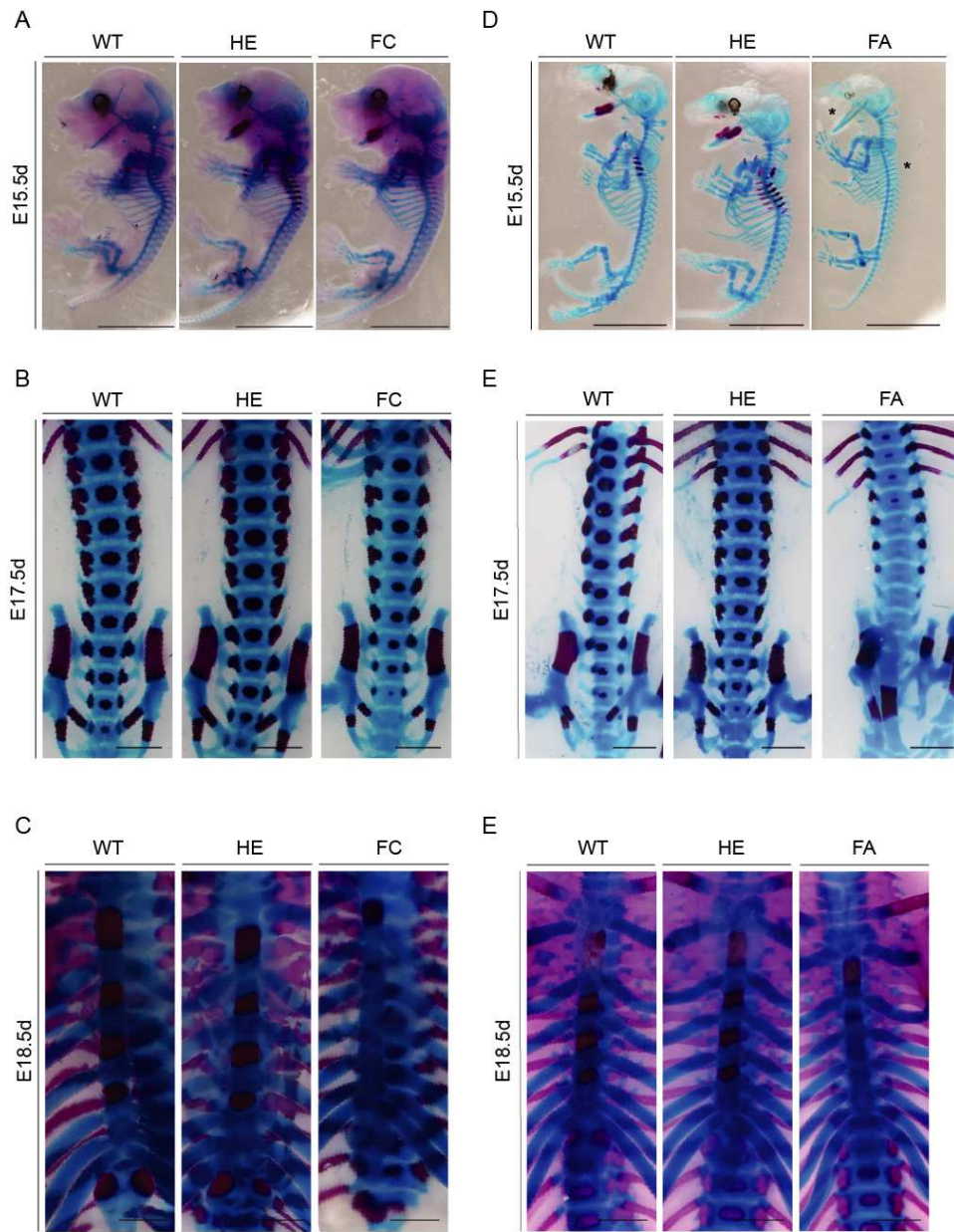


Figure S3.1. Mineralization delay in *FancC*<sup>-/-</sup> and *Fanca*<sup>-/-</sup> mice.

(A, D) Representative skeletal preparations of *FancC*<sup>-/-</sup> (C), *FancC*<sup>+/-</sup> (HE) and wild-type (WT) littermates (left panel) and *FancA*<sup>-/-</sup> (A), *FancA*<sup>+/-</sup> (HE) and wild-type (WT) littermates (right panel) at embryonic day 15.5 double-stained with Alcian Blue (for cartilaginous matrice) and Alizarin Red (for mineralized cartilaginous and bony matrices). (B, D) Magnification of irregular bone *FancC*<sup>-/-</sup> (C), *FancC*<sup>+/-</sup> (HE) and wild-type (WT) littermates (left panel) and *FancA*<sup>-/-</sup> (A), *FancA*<sup>+/-</sup> (HE) and wild-type (WT) littermates (right panel) vertebrae at E17.5d. (C, E) Magnification of irregular bone *FancC*<sup>-/-</sup> (C), *FancC*<sup>+/-</sup> (HE) and wild-type (WT) littermates (left panel) and *FancA*<sup>-/-</sup> (A), *FancA*<sup>+/-</sup> (HE) and wild-type (WT) littermates (right panel) sternum at E18.5d.



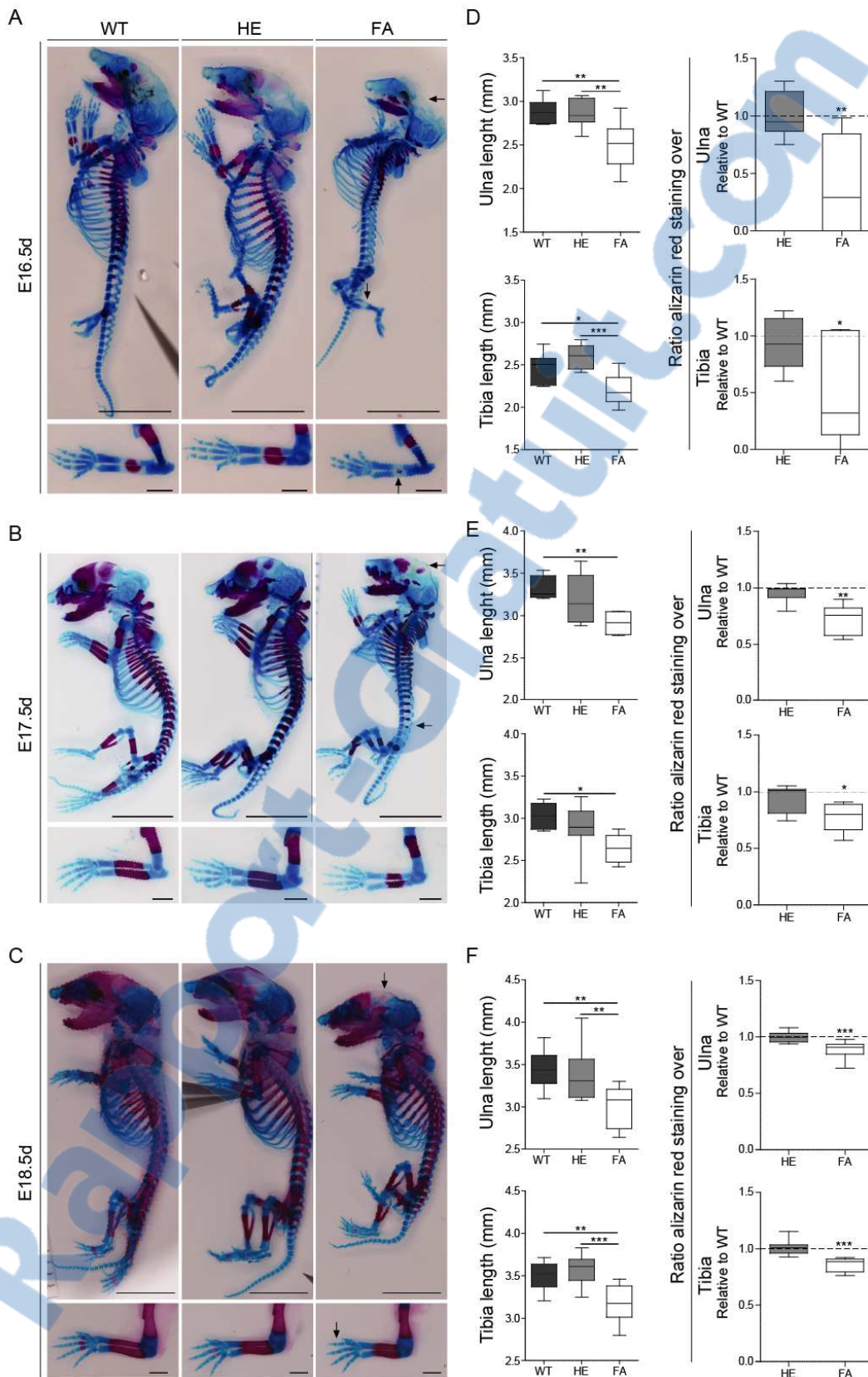


Figure S3.2. Skeletal development of *Fanca*<sup>-/-</sup> embryos.

(A-C) Representative skeletal preparations of *FancA*<sup>-/-</sup> (C), *FancA*<sup>+/-</sup> (HE) and wild-type (WT) littermates at embryonic day 16.5, 17.5 and 18.5 double-stained with Alcian Blue (for cartilaginous matrice) and Alizarin Red (for mineralized cartilaginous and bony matrices). Arrows in *FancA*<sup>-/-</sup> embryos indicate area with mineralization compared to WT. Lines indicate magnification (5mm for whole body picture, 1mm for forearms magnification). (D-F) Box and whiskers graphs showing bone lengths (left panels) and mineralization area of ulnae and tibiae (ratio of Alizarin Red staining to bone length; right panels) at embryonic day 16.5 (D), 17.5 (E) and 18.5 (F) of *FancA*<sup>-/-</sup> (C; n=6 to 13), *FancA*<sup>+/-</sup> (HE; n=7 to 11) and wild-type (WT; n=6 to 8) littermates. Error bars represent SD. \*p<0.05, \*\*p<0.005, p<0.0005.

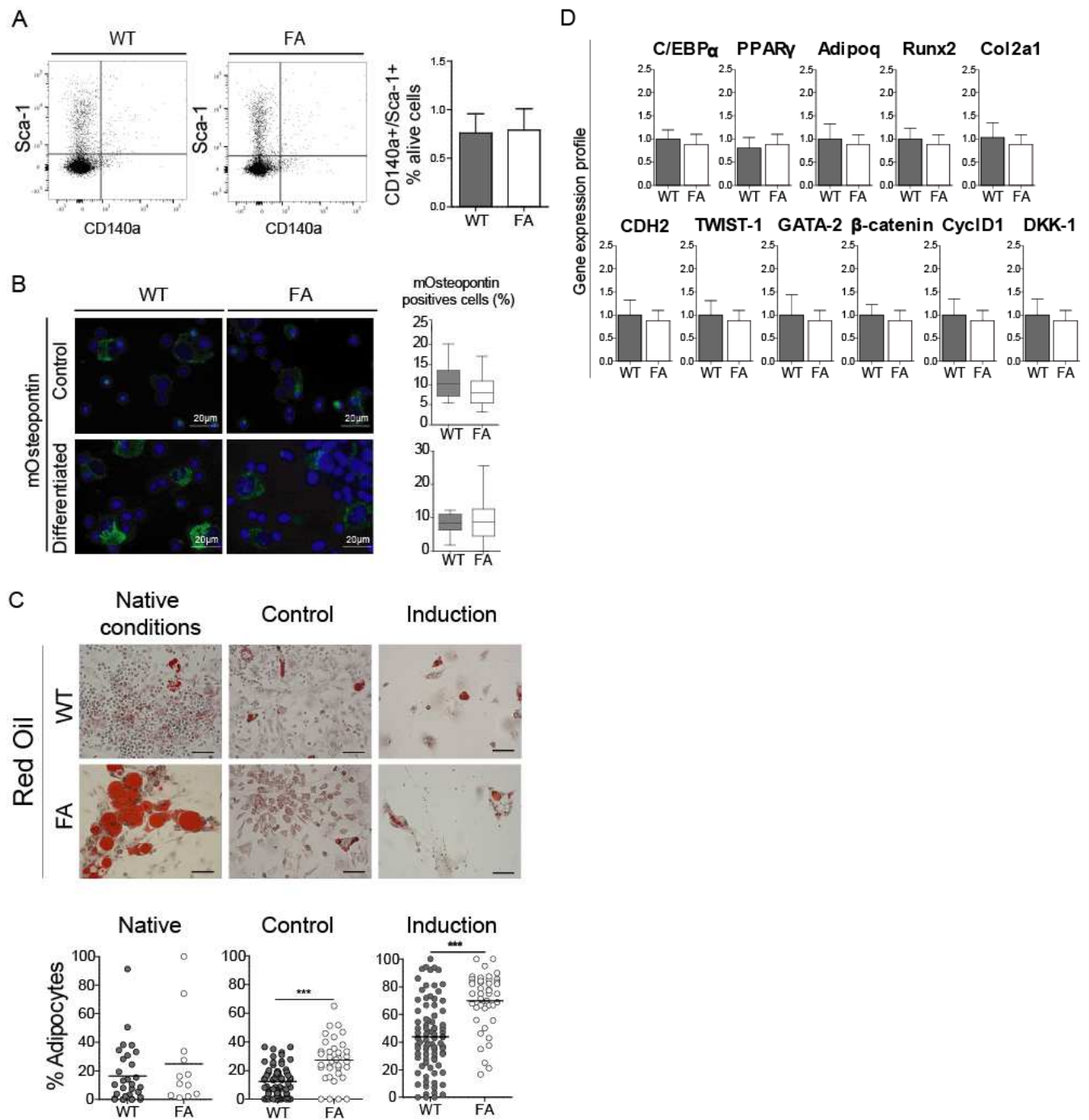


Figure S3.4. Phenotypic profile and differentiation abilities of *Fanca*<sup>-/-</sup> bone marrow stromal cells.

(A) Frequency of CD140<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup> population in freshly harvested bone marrow stromal cells (BMSCs) from wild-type (WT; 3 males, 4 females) and *FancA*<sup>-/-</sup> (A; 3 males, 4 females) mice. Cell population gated on viable single cells. (B) Representative picture of osteogenic induction of wild-type (left panel) and *FancC*<sup>-/-</sup> (right panel) BMSCs cultured without (upper panel) or with (lower panel) differentiation medium. Osteogenic-induced cells are stained with anti-mOsteopontin (green). Nucleus are stained with DAPI. Quantification of osteogenic-induced BMSCs (mOsteopontin positive cells) from wild-type (WT; 5 males, 2 females) and *FancA*<sup>-/-</sup> (A; 2 males, 2 females) mice after culture without (upper graph) or with (lower graph) differentiation medium. Percent of positive cells, min 50 cells by picture, 6 pictures by mouse. (C) Representative image and ratio of RO positive adipocytes to cell number of BMSCs from wild-type (WT; 4 males) and *FancA*<sup>-/-</sup> (A; 2 males, 2 females) mice after harvest (left panel) culture without (middle panel) or with (right panel) differentiation medium. Min of 4 pictures per mice. Scale bars = 50  $\mu$ m. \*\*\*p<0.0005. (E) RT-qPCR analyses BMSCs from male and female wild-type (WT; 4 males) and *FancA*<sup>-/-</sup> (A; 3 males, 1 females). Values relative to WT and normalized to SDHA-ACTB geomean. Error bars represent SD.

**Table S3.1 : List of RT-qPCR primers**

<b>Genes of interest</b>	<b>Forward primers</b>	<b>Reverse primers</b>
<b>ACTB</b>	CTCTGGCTCCTAGCACCATGAAGA	GTAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG
<b>Adipoq</b>	GAGAAGGGAGAGAAAGGAGATG	TGAGCGATACACATAAGCGG
<b>ALP</b>	CTCAAAAGCTCAACACCAATG	ATTGTGCCATCTCCAGCCG
<b>B2M</b>	CTGCTACGTAACACAGTTCCACCC	CATGATGCTTGATCACATGTCTCG
<b>Bcat</b>	GCTATTCCACGACTAGTTCAGC	AGCTTCAGTACACCCTTCTAC
<b>BMP-2</b>	CGCAGCTTCCATCACGAA	TGCAGATGTGAGAAACTCGTC
<b>C/EBPa</b>	AGAGCCGAGATAAAAGCCAAAC	TCATTGTCACTGGTCAACTCC
<b>CDH2</b>	CITCCTTGCTTCTGACAATGG	TGAGTTGGGTCTGGAGTTTC
<b>Colla1</b>	CATAAAGGGTCATCGTGGCT	TTGAGTCCGTTTGGCCAG
<b>Col2a1</b>	TCCCTGCGATGACATTATCTG	TCTCTCTTCTGCCCCCTTG
<b>CyclD1</b>	GCCCTCCGTATCTTACTTCAAG	GCGGTCCAGGTAGTTCAT
<b>Dkk-1</b>	CTTGCGCTGAAGATGAGGAGT	GAGGGCATGCATATTCATTT
<b>GATA-2</b>	CCCCTAAGCAGAGAAGCAAG	ATTCATCTTGTGGTAGAGCCC
<b>Osteocalcin</b>	ACCATCTTCTGCTCACTCTG	GTTCACTACCTTATTGCCCTCC
<b>Osterix</b>	CCTCTCCCTTCTCCCTCTC	CTGGAGCCATAGTGAGCTTC
<b>PPARg2</b>	TGTTATGGGTGAAACTCTGGG	AGAGCTGATTCGGAAGTTGG
<b>RunX2</b>	GCTATTAAAGTGACAGTGGACGG	GGCGATCAGAGAACAAACTAGG
<b>SDHA</b>	CCTACCCGATCACATACTGTTG	AGTTGTCCTCTTCCATGTTCC
<b>SOST</b>	ACAACCAGACCATGAACCG	CAGGAAGCGGGTGTAGTG
<b>Sox9</b>	CAAGACTCTGGGCAAGCTC	GGGCTGGTACTTGTAATCGG
<b>TWIST-1</b>	CTCAGCTACGCCTTCTCC	ACTGTCCATTTCTCCTTCTCTG

## Chapitre 4 : Discussion et conclusion

### 4.1. Caractérisation du développement squelettique embryonnaire

Les travaux de recherche réalisés au cours de mon doctorat m'ont permis d'étudier de nombreux paramètres jusqu'ici inexplorés chez les souris Fanconi.

Plusieurs groupes de recherche ainsi que le nôtre ont rapporté une fréquence de distribution non mendélienne des gènes Fanconi dans des modèles de souris Fanconi, suggérant une mortalité embryonnaire chez les homozygotes (Carreau 2004; Houghtaling et al. 2003; Kamimae-Lanning, Goloviznina, and Kurre 2013). Grâce au génotypage des embryons, nous avons pu corréliser la fréquence de distribution non mendélienne des gènes Fanconi dans les portées après sevrage à la diminution du nombre de souriceaux Fanconi survivants après l'accouchement dans les souris *FancA*<sup>+/-</sup> et *FancC*<sup>+/-</sup>. Nous avons ainsi pu déterminer que la distribution des gènes *FancA*<sup>-/-</sup> et *FancC*<sup>-/-</sup> à la descendance est mendélienne.

La diminution du nombre d'individus Fanconi observée post-sevrage est sûrement liée au fait que la mère doit manger les souriceaux les plus fébriles, à savoir les individus Fanconi. Car l'analyse du squelette embryonnaire des souris Fanconi nous a permis de démontrer que les individus Fanconi sont en effet plus petits à la naissance. Une observation qui a récemment été rapportée chez les souris *FancC*<sup>-/-</sup> / *FancG*<sup>-/-</sup> et que l'on retrouve également chez des nouveau-nés qui, après fécondation *in vitro*, ont été exposés dans un milieu contenant la protéine DKK1 avant d'être transférés dans des mères porteuses (Houghtaling et al. 2003; Tríbulo et al. 2017; Zhou et al. 2017). Il se peut également que ces individus ne soient pas nés viables. En effet, il a été démontré que la diminution du nombre de nouveau-nés dans les souris maintenues en animalerie n'est pas due à des infanticides, mais à l'élimination des souriceaux mort-nés (Weber et al. 2013). L'hypothèse de la mortalité au cours de la gestation pourrait être confirmée ou invalidée en surveillant l'accouchement des souris *FancA*<sup>+/-</sup> et *FancC*<sup>+/-</sup>.

Cette mortalité embryonnaire liée au phénotype Fanconi pourrait se refléter chez l'humain par une augmentation du risque de fausses couches dans les familles où les parents sont hétérozygotes pour le même gène Fanconi. Des données qui sont encore inaccessibles à l'heure actuelle.

Il est fréquemment rapporté dans la littérature que les modèles murins Fanconi ne sont pas totalement représentatifs de la pathologie, car le phénotype des souris n'est pas identique en tous points à celui des patients (Bakker, de Winter, and te Riele 2013). Ces résultats sont donc très importants pour la poursuite de la recherche sur l'anémie de Fanconi, car ils nous indiquent que les souris utilisées couramment à des fins d'expérimentation ont un phénotype similaire à celui des patients et mais aussi sont probablement celles dont le phénotype est le moins sévère. Il est également probable que les études réalisées sur les patients Fanconi ne prennent en compte que les individus dont le phénotype est moins prononcé. Une hypothèse qui est appuyée par une étude rapportant de nombreuses interruptions médicales de grossesse au sein de la même famille liées à l'observation de malformations congénitales trop sévères chez les fœtus, qui ont été par la suite identifiés comme des individus Fanconi (Nicchia et al. 2015).

L'analyse du développement embryonnaire nous a aussi permis de confirmer que les souris Fanconi partagent un phénotype similaire de retard de croissance avec les patients Fanconi. Ces résultats démontrent que les protéines Fanconi sont impliquées dans le développement du système squelettique au cours de l'embryogenèse. La nature exacte de leur rôle dans ce processus reste encore à explorer. L'évaluation de la croissance des embryons a été effectuée en mesurant la longueur des os longs. L'absence de plaque de croissance à ce stade développemental nous permet d'écarter l'hypothèse d'un défaut lié à la stimulation des chondrocytes lors de croissance longitudinale des os.

Nous avons également mis en évidence un défaut de minéralisation chez les souris Fanconi et ce, dans les os formés par processus d'ossification intramembranaire et endochondrale, ce qui écarte définitivement les chondrocytes des causes probables du défaut de minéralisation. Afin de permettre la minéralisation du tissu osseux dans les os longs, la matrice cartilagineuse doit être initialement dégradée par des ostéoclastes/chondroclastes puis les cellules mésenchymateuses doivent se différencier en ostéoblastes, sécréter la matrice osseuse et induire sa minéralisation (Long and Ornitz 2013; Mackie et al. 2008; Ortega et al. 2004).

La présence d'une partie non cartilagineuse et non minéralisée dans la diaphyse des os longs des embryons Fanconi nous indique que le retard de minéralisation n'est pas dû à un défaut de dégradation du tissu osseux par les ostéoclastes/chondroclastes mais semble provenir soit d'un défaut de production de matrice osseuse, soit de sa minéralisation. Ce défaut pourrait

provenir d'une défaillance de l'activité ostéoblastique chez l'embryon. Afin de répondre à cette question, il serait intéressant d'analyser la formation et la calcification des os des embryons Fanconi grâce à une coloration immunohistochimique Goldner (Goldner 1938).

Mais il est également possible que le retard de minéralisation soit dû à une déficience en minéraux circulants chez les embryons Fanconi. Chez l'embryon, le placenta est la source principale d'apport en minéraux (Brunette 1988). Leur transport calcique est régulé par les hormones PTHrP et PTH qui sont produites par l'embryon et stimulent le transport de calcium mais également la prolifération des chondrocytes (Kovacs 2011). Il est probable que ce transport soit affecté chez les souris Fanconi. Néanmoins, le phénotype des embryons déficients en hormones PTHrP ou PTH ne présente pas de retard de minéralisation tel que celui observé au cours de mes travaux de recherche (Miao et al. 2002). Au cours des césariennes, j'ai toutefois noté que le placenta de nombreux embryons Fanconi était moins développé et beaucoup moins vascularisé que celui des autres embryons, ce qui pourrait suggérer une altération de sa capacité de transport des minéraux de la mère vers l'embryon.

Afin de déterminer les conséquences du retard de croissance et du défaut de minéralisation osseuse des embryons Fanconi chez les souris adultes, la structure, la force de résistance et l'activité métabolique du tissu osseux des souris adultes Fanconi ont été évaluées.

#### 4.2. Intégrité et activité métabolique du tissu osseux chez la souris adulte

Grâce à ces expériences réalisées chez la souris, nous avons pu étudier le phénotype osseux en conditions natives, sans prise de médication ou traitements délétères pour le tissu osseux.

Ainsi, nous avons pu établir un lien entre les retards de minéralisation dans les embryons *FancC*<sup>-/-</sup> et une diminution de la densité minérale osseuse dans les souris adultes *FancC*<sup>-/-</sup>. Pour les paramètres osseux étudiés par micro-CT-scan, la densité minérale osseuse, le contenu minéral, les diamètres internes et externes de l'os cortical ainsi que le volume osseux, nous avons observé une grande variabilité entre les souris Fanconi reflétant celle observée chez les patients (Shimamura and Alter 2010). Pour chacun des paramètres, on remarque qu'il y a une diminution de la valeur de la moyenne dans les souris Fanconi par rapport aux souris sauvages qui semble



indiquer une fragilité osseuse chez les souris Fanconi. Suite à l'analyse de la force osseuse, nous avons mis en évidence que la diminution de la densité minérale osseuse s'accompagne effectivement d'une diminution très marquée de la résistance osseuse et de la charge maximale supportée par les fémurs des souris Fanconi. Ce phénotype très marqué chez les souris adultes pourrait se traduire chez l'humain par un risque plus important de fracture osseuse chez les patients Fanconi.

De manière très surprenante, cette fragilité osseuse n'apparaît que chez les individus de sexe masculin alors que les défauts observés chez l'embryon affectent tout autant les mâles que les femelles. L'évaluation de la résistance osseuse des souris à l'âge adulte ajoute un important facteur à prendre en compte dans l'analyse des données : la différence liée au genre dans la croissance des os longs. Chez l'Homme, les différences dans la longueur des os observées entre les genres sont principalement dues à une production plus tardive d'hormones sexuelles à la puberté, retardant chez les mâles la minéralisation du cartilage de conjugaison. Cependant, les différences au niveau de la structure de l'os résultent d'une croissance appositionnelle périostée plus importante chez les mâles que chez les individus femelles, qui conduit ultimement à l'augmentation du diamètre de l'os cortical chez les mâles (Frame 1971). Ce processus est contrôlé par la testostérone, l'hormone de croissance et l'hormone IGF-1 (Yeh, Chen, and Aloia 1996; Zhang et al. 1999). Chez les souris et les humains Fanconi, de nombreux cas d'hypogonadisme ont été reportés (Chen et al. 1996; Giri et al. 2007; Petryk, Kanakatti Shankar, et al. 2015; Rose et al. 2012; Wajnrajch et al. 2001; Wong et al. 2003). La diminution de la production de testostérone pourrait expliquer la diminution de la résistance osseuse chez les souris mâles Fanconi à une valeur moyenne identique à celle des femelles. Une hypothèse qu'il serait très intéressant d'explorer en évaluant l'effet de la castration, de l'administration de testostérone et de la castration couplée à une thérapie de remplacement hormonal sur la résistance osseuse des souris mâles Fanconi.

Nous avons également voulu déterminer si les défauts osseux découverts chez les souris Fanconi résultaient d'un défaut de formation du tissu osseux. Chez l'adulte, nous avons démontré *in vitro* que les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse des souris *FancA*<sup>-/-</sup> et *FancC*<sup>-/-</sup> peuvent se différencier en ostéoblastes et sécréter certaines protéines de la matrice osseuse (Figures 3.4C et S3.4C). L'analyse histomorphométrique des tibias des souris Fanconi nous a permis de mettre en évidence que la capacité de production d'une matrice

minéralisée *in vivo* chez les souris Fanconi était non seulement effective, mais supérieure à celle des souris sauvages. Ces expériences ne concernant que l'os trabéculaire, il serait intéressant d'évaluer si cette activité de formation est également supérieure dans l'os cortical des souris Fanconi.

En contradiction avec nos résultats, les travaux de Zhou et collègues mettent en évidence la diminution du niveau de l'alkaline phosphatase dans des cellules de moelle osseuse de souris *FancC*<sup>-/-</sup> / *FancG*<sup>-/-</sup> après différenciation en ostéoblastes. L'activité alcaline phosphatase étant indispensable pour l'augmentation de la concentration en ions phosphates nécessaire à la formation des cristaux d'hydroxyapatite, la diminution de son activité dans les ostéoblastes pourrait indiquer des défauts de minéralisation chez les souris Fanconi. Bien que cette explication mécanistique pourrait expliquer le retard de minéralisation observé dans les embryons Fanconi, nous avons observé une surexpression du transcrit de l'alkaline phosphatase dans les cellules osseuses des souris adultes *FancC*<sup>-/-</sup>. Cette observation ne garantit cependant pas que la protéine soit surexprimée chez l'embryon ou produite et fonctionnelle chez l'adulte *in vivo*. Des questions auxquelles des expériences de qPCR et d'ELISA pourraient aisément répondre.

Nous avons vu que ces analyses mettent en évidence une différence de phénotype entre les souris de lignées *FancA*<sup>-/-</sup> et *FancC*<sup>-/-</sup>, notamment dans la croissance chez les embryons. Différences que l'on retrouve également dans d'autres expérimentations détaillées dans le chapitre 4 et entre les résultats de notre groupe et celui de Zhou et collègues qui étudie les souris *FancC*<sup>-/-</sup> / *FancG*<sup>-/-</sup>. Elles peuvent être dues à des différences propres aux fonctions des protéines Fanconi dans le métabolisme osseux ou aux différences de conditions expérimentales entre nos groupes de recherche. Cependant, la mise en évidence de l'altération du tissu osseux dans trois modèles murins de la maladie et deux équipes de recherche différentes confirment que les problèmes osseux ne sont pas anecdotiques dans l'anémie de Fanconi mais bien une pathologie latente.

#### 4.3. Défauts osseux et mécanismes sous-jacents

Afin d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans l'altération de l'intégrité de l'os chez les souris Fanconi, nous avons étudié l'expression des marqueurs et des gènes responsables de la différenciation des cellules ostéoblastiques dans les cellules du tissu osseux. Nous avons ainsi mis en évidence la surexpression du gène *Runx2*, régulateur principal de la

différenciation des cellules mésenchymateuses en ostéoblastes dans les cellules osseuses. De nombreux facteurs paracrines et endocrines régulent l'expression du gène *Runx2* dont les protéines BMPs et des protéines modulatrices de la voie de signalisation Wnt (Rutkovskiy, Stensløkken, and Vaage 2016). Les protéines BMP sont notamment importantes pour l'ossification postnatale (Long 2011). Elles activent la transcription du gène *Runx2* et promeuvent la transcription de ses cibles (Chen et al. 1997). L'activation de la voie de Wnt/ $\beta$ -caténine active également la transcription du gène *Runx2* et l'expression ectopique de ligands Wnt induit une différenciation ostéoblastique des cellules souches mésenchymateuses (Day et al. 2005; Takada, Kouzmenko, and Kato 2009). Ici, la surexpression de *Runx2* dans les cellules du tissu osseux des souris *FancC*<sup>-/-</sup> est indépendante de la voie de Wnt, mais accompagnée de la surexpression du gène *BMP-2*. Une observation qui indique une forte inclinaison vers la différenciation des cellules ostéoblastiques ou un nombre très supérieur d'ostéoblastes dans les fémurs des souris Fanconi. De plus, les marqueurs des ostéoblastes sont également surexprimés dans ces cellules (OCN, OSX et ALP). Cependant, pour permettre la différenciation terminale des ostéoblastes en ostéocytes, le gène *Runx2* se doit être réprimé (Long 2011). Les ostéocytes matures expriment par la suite le marqueur SOST, ce qui n'est pas le cas dans les cellules osseuses des souris *FancC*<sup>-/-</sup> (Franz-Odendaal et al. 2006).

À la lumière de ces observations, il est possible d'imaginer que les ostéoblastes ne puissent se différencier en ostéocytes suite à l'expression constitutive du gène *Runx2*. L'altération de l'expression de *Runx2* pourrait également expliquer les problèmes de minéralisation osseuse observés chez l'embryon. Une hypothèse qui pourrait être validée par l'analyse de l'expression génique des ostéoblastes chez l'embryon.

Ici, il est toutefois important de noter qu'il est très ardu d'isoler cette population osseuse particulière pour l'analyse par qPCR étant donné leur difficulté d'accès et la nature même du tissu dans lequel elles vivent. L'ensemble de ces travaux reposent donc sur une étude où les types cellulaires osseux sont mélangés et l'interprétation des données se doit de ne pas négliger le biais. De manière surprenante, cette analyse a également mis en évidence la surexpression des marqueurs chondrocytaires alors que l'expression du gène responsable de la différenciation chondrocytaire, *Sox9*, n'est pas modifiée. Une analyse du nombre de chondrocytes sur coupe histologique nous permettrait de déterminer si cette augmentation est liée à une augmentation du nombre de cellules ou de leur activité.

Il est important de remarquer que les différences observées dans l'expression génique s'appliquent aux deux genres, mâles et femelles, et ne permettent donc pas d'expliquer le phénotype de fragilité osseuse, mais peuvent être liées à celui de la diminution de la densité minérale osseuse.

À l'exception des ostéoclastes, les cellules du tissu osseux proviennent des cellules souches mésenchymateuses. Nous avons donc étudié leur phénotype dans le contexte de l'anémie de Fanconi afin de déterminer leur rôle dans l'altération du tissu osseux observé chez les souris *FancA*<sup>-/-</sup> et *FancC*<sup>-/-</sup>. Malgré une fréquence similaire en cellules progénitrices entre les souris sauvages et Fanconi, on observe une diminution de leur capacité de différenciation en ostéoblastes et une orientation préférentielle vers la différenciation adipocytaire. Observation également effectuée chez les souris *FancC*<sup>-/-</sup> / *FancG*<sup>-/-</sup> (Zhou et al. 2017). Nous n'avons cependant pas identifié le mécanisme responsable de cette orientation préférentielle pour la lignée adipocytaire bien que l'expression des gènes *Pparγ* et *Adipoq* soit sensiblement augmentée dans les cellules stromales. Il serait intéressant d'étudier l'effet d'inhibiteurs de la différenciation adipocytaire tels que *Wnt3a* sur la différenciation ostéoblastique des cellules souches mésenchymateuses Fanconi afin de déterminer s'il y a un appauvrissement en cellules ostéoblastiques dû au biais de différenciation des cellules mésenchymateuses vers la différenciation adipocytaire.

On peut noter avec intérêt la diminution de l'expression du gène *Gata-2* dans les cellules souches mésenchymateuses Fanconi. Cette protéine est un facteur de transcription initialement identifié comme régulateur de la prolifération et différenciation des cellules souches hématopoïétiques (Okitsu et al. 2007). Son inhibition favorise également l'adipogenèse tout en diminuant la prolifération des cellules souches hématopoïétiques (Kamata et al. 2014). Sa surexpression dans les cellules stromales pourrait avoir un effet positif sur l'adipogenèse mais également sur l'hématopoïèse dans un contexte Fanconi en influençant l'activité mitotique et la différenciation des deux types de cellules souches du stroma.

Initialement guidés dans l'étude du tissu osseux par la surexpression de DDK1 dans le plasma des souris Fanconi, nous avons depuis confirmé cette observation dans le plasma des patients. Cependant, cette surexpression ne modifie pas l'expression des gènes cibles de la voie de signalisation de Wnt/ $\beta$ -caténine ni dans les cellules osseuses, ni dans les cellules stromales et

ne semble donc pas cibler ces types cellulaires. L'analyse de l'expression de DKK1 dans les cellules osseuses et stromales nous a permis de mettre en évidence l'origine stromale de la production de DKK1 chez les souris *FancC*<sup>-/-</sup>. Cette production pourrait avoir un effet paracrine, sur les autres cellules du stroma, ou endocrine, sur des types cellulaires plus distants de la moelle osseuse. Cela étant, bien que la surexpression de DKK1 ne semble pas cibler les cellules osseuses chez les souris Fanconi, il serait intéressant de déterminer si le niveau plasmatique de cette protéine chez les patients peut également être utilisé comme un marqueur de diminution de la densité minérale osseuse dans le contexte de l'anémie de Fanconi (Butler et al. 2011).

## CONCLUSION

L'ensemble de ces travaux a permis de mettre en évidence l'altération du développement du système squelettique dans les souris *FancA*<sup>-/-</sup> et *FancC*<sup>-/-</sup>. Ces résultats démontrent que les protéines Fanconi sont essentielles pour le développement du tissu osseux, le maintien de l'intégrité du tissu osseux et la différenciation des cellules souches mésenchymateuses chez l'adulte. De plus, ces résultats renforcent la validité de nos modèles murins Fanconi *FancA*<sup>-/-</sup> et *FancC*<sup>-/-</sup> étant donné qu'ils mettent en avant la similitude du phénotype osseux des souris avec celui des patients. Grâce aux souris, nous pouvons étudier le phénotype osseux et tenter d'expliquer les mécanismes de son altération en éliminant les variables dues aux traitements des patients. D'un point de vue clinique, ces résultats dévoilent une fragilité osseuse avec un risque accru de fractures, notamment chez les patients mâles, qu'il apparaît indispensable de prendre en compte lors de la prise en charge thérapeutique des patients.

Grâce à l'amélioration des protocoles de transplantation osseuse, l'espérance de vie augmente chez les patients Fanconi et le maintien de l'intégrité du tissu osseux se doit d'être un facteur à considérer dans la perspective du confort de vie du patient, une fois les risques hématologiques écartés.

## Références

- Akiyama, H., Marie-Christine Chaboissier, James F. Martin, Andreas Schedl, and Benoit de Crombrughe. 2002. "The Transcription Factor Sox9 Has Essential Roles in Successive Steps of the Chondrocyte Differentiation Pathway and Is Required for Expression of Sox5 and Sox6." *Genes & Development* 16(21):2813–28.
- Alter, Blanche P. 2003a. "Cancer in Fanconi Anemia, 1927-2001." *Cancer* 97(2):425–40.
- Alter, Blanche P. 2003b. "Inherited Bone Marrow Failure Syndromes." Pp. 280–365 in *Nathan DG, Oski SH, Loken AT, Gindsburg D, eds. Nathan and Oski's Hematology and Oncology of Infancy and Childhood*. Philadelphia: PA: WB Saunders.
- Alter, Blanche P. 2017. "Inherited Bone Marrow Failure Syndromes: Considerations Pre- and Posttransplant." *Blood* 130(21):2257–64.
- Alter, Blanche P., Neelam Giri, Sharon A. Savage, and Philip S. Rosenberg. 2016. "Cancer in the National Cancer Institute Inherited Bone Marrow Failure Syndrome Cohort after 15 Years of Follow-Up." *Blood* 128(22).
- Ameziane, Najim et al. 2015. "A Novel Fanconi Anaemia Subtype Associated with a Dominant-Negative Mutation in RAD51." *Nature Communications* 6:8829.
- Andersen, Thomas Levin et al. 2009. "A Physical Mechanism for Coupling Bone Resorption and Formation in Adult Human Bone." *The American Journal of Pathology* 174(1):239–47.
- Asada, Noboru and Yoshio Katayama. 2014. "Regulation of Hematopoiesis in Endosteal Microenvironments." *International Journal of Hematology* 99(6):679–84.
- Asada, Noboru, Shoichiro Takeishi, and Paul S. Frenette. 2017. "Complexity of Bone Marrow Hematopoietic Stem Cell Niche." *International Journal of Hematology* 106(1):45–54.
- Aszódi, Attila, John F. Bateman, Erika Gustafsson, Ray Boot-Handford, and Reinhard Fässler. 2000. "Mammalian Skeletogenesis and Extracellular Matrix. What Can We Learn from Knockout Mice?" *Cell Structure and Function* 25(2):73–84.
- Auerbach, Arleen D. 2009. "Fanconi Anemia and Its Diagnosis." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 668(1–2):4–10.
- Augello, Andrea and Cosimo De Bari. 2010. "The Regulation of Differentiation in Mesenchymal Stem Cells." *Human Gene Therapy* 21(10):1226–38.
- Bachman, Eric et al. 2014. "Testosterone Induces Erythrocytosis via Increased Erythropoietin and Suppressed Hepcidin: Evidence for a New Erythropoietin/hemoglobin Set Point." *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 69(6):725–35.

- Bagby, Grover C. and Gabrielle Meyers. 2007. "Bone Marrow Failure as a Risk Factor for Clonal Evolution: Prospects for Leukemia Prevention." *Hematology. American Society of Hematology. Education Program* 2007(1):40–46.
- Bakker, Sietske T., Johan P. de Winter, and Hein te Riele. 2013. "Learning from a Paradox: Recent Insights into Fanconi Anaemia through Studying Mouse Models." *Disease models & mechanisms* 6:40–47.
- Bara, Jennifer J., R.Geoff Richards, Mauro Alini, and Martin J. Stoddart. 2014. "Concise Review: Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Change Phenotype Following In Vitro Culture: Implications for Basic Research and the Clinic." *STEM CELLS* 32(7):1713–23.
- Bayraktar, Harun H. et al. 2004. "Comparison of the Elastic and Yield Properties of Human Femoral Trabecular and Cortical Bone Tissue." *Journal of Biomechanics* 37(1):27–35.
- Berendsen, Agnes D. and Bjorn R. Olsen. 2015. "Bone Development." *Bone* 80:14–18.
- Bierings, Marc et al. 2018. "Transplant Results in Adults with Fanconi Anaemia." *British Journal of Haematology* 180(1):100–109.
- Bonewald , L. F. 2007. "Osteocytes as Dynamic Multifunctional Cells." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1116(1):281–90.
- Bonewald, Lynda F. 2011. "The Amazing Osteocyte." *Journal of Bone and Mineral Research* 26(2):229–38.
- Bonjour, J.Ph., G. Theintz, F. Law, D. Slosman, and R. Rizzoli. 1994. "Peak Bone Mass." *Osteoporosis International* 4(S1):S7–13.
- Boulais, PE and PS Frenette. 2015. "Making Sense of Hematopoietic Stem Cell Niches." *Blood* 125(17):2621–30.
- Boyle, William J., W.Scott Simonet, and David L. Lacey. 2003. "Osteoclast Differentiation and Activation." *Nature* 423(6937):337–42.
- Brodsky, Barbara and Anton V. Persikov. 2005. "Molecular Structure of the Collagen Triple Helix." Pp. 301–39 in *Advances in protein chemistry*, vol. 70.
- Bruderer, M., R. G. Richards, M. Alini, and Martin J. Stoddart. 2014. "Role and Regulation of runx2 in Osteogenesis." *European Cells and Materials* 28:269–86.
- Brunette, M. G. 1988. "Calcium Transport through the Placenta." *Canadian journal of physiology and pharmacology* 66(10):1261–69.
- Buckwalter, J. A., M. J. Glimcher, R. R. Cooper, and R. Recker. 1996. "Bone Biology. I: Structure, Blood Supply, Cells, Matrix, and Mineralization." *Instructional course lectures* 45:371–86.

- Burger, E. H., J. W. van der Meer, and P. J. Nijweide. 1984. "Osteoclast Formation from Mononuclear Phagocytes: Role of Bone-Forming Cells." *The Journal of cell biology* 99(6):1901–6.
- Butler, Joseph S. et al. 2011. "The Role of Dkk1 in Bone Mass Regulation: Correlating Serum Dkk1 Expression with Bone Mineral Density." *Journal of Orthopaedic Research* 29(3):414–18.
- Butturini, a et al. 1994. "Hematologic Abnormalities in Fanconi Anemia: An International Fanconi Anemia Registry Study." *Blood* 84(5):1650–55.
- Calvi, L. M. et al. 2003. "Osteoblastic Cells Regulate the Haematopoietic Stem Cell Niche." *Nature* 425(6960):841–46.
- Calvi, Laura M. and Daniel C. Link. 2014. "Cellular Complexity of the Bone Marrow Hematopoietic Stem Cell Niche." *Calcified Tissue International* 94(1):112–24.
- Cancedda, R., P. Castagnola, F. Descalzi Cancedda, B. Dozin, and R. Quarto. 2000. "Developmental Control of Chondrogenesis and Osteogenesis." *International Journal of Developmental Biology* 44(6):707–14.
- Caplan, A. I. 1988. "Bone Development." *Ciba Foundation symposium* 136:3–21.
- Caplan, Arnold I. 1987. "Bone Development and Repair." *BioEssays* 6(4):171–75.
- Capulli, Mattia, Riccardo Paone, and Nadia Rucci. 2014. "Osteoblast and Osteocyte: Games without Frontiers." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 561:3–12.
- Carreau, Madeleine. 2004. "Not-so-Novel Phenotypes in the Fanconi Anemia Group D2 Mouse Model." *Blood* 103(6):2430.
- Ceccaldi, Raphael, Prabha Sarangi, and Alan D. D'Andrea. 2016. "The Fanconi Anaemia Pathway: New Players and New Functions." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17(6):337–49.
- Cerabona, Donna, Zejin Sun, and Grzegorz Nalepa. 2016. "Leukemia and Chromosomal Instability in Aged *Fancc*<sup>-/-</sup> Mice." *Experimental Hematology* 44(5):352–57.
- Cervenka, J., D. Arthur, and C. Yasis. 1981. "Mitomycin C Test for Diagnostic Differentiation of Idiopathic Aplastic Anemia and Fanconi Anemia." *Pediatrics* 67(1):119–27.
- Chen, D. et al. 1997. "Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2) Enhances BMP-3, BMP-4, and Bone Cell Differentiation Marker Gene Expression during the Induction of Mineralized Bone Matrix Formation in Cultures of Fetal Rat Calvarial Osteoblasts." *Calcified tissue international* 60(3):283–90.
- Chen, M. et al. 1996. "Inactivation of *Fac* in Mice Produces Inducible Chromosomal Instability and Reduced Fertility Reminiscent of Fanconi Anaemia." *Nature genetics* 12(4):448–51.



- Cheung, Ronald S. and Toshiyasu Taniguchi. 2017. "Recent Insights into the Molecular Basis of Fanconi Anemia: Genes, Modifiers, and Drivers." *International Journal of Hematology* 106(3):335–44.
- Church, Vicki L. and Philippa Francis-West. 2002. "Wnt Signalling during Limb Development." *The International journal of developmental biology* 46(7):927–36.
- Clarke, Bart. 2008. "Normal Bone Anatomy and Physiology." *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 3(Supplement 3):S131–39.
- Colón-Emeric, Cathleen S. and Kenneth G. Saag. 2006. "Osteoporotic Fractures in Older Adults." *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 20(4):695–706.
- Cooper, C., G. Campion, and L. J. Melton. 1992. "Hip Fractures in the Elderly: A World-Wide Projection." *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 2(6):285–89.
- Coutinho, Agnes E. and Karen E. Chapman. 2011. "The Anti-Inflammatory and Immunosuppressive Effects of Glucocorticoids, Recent Developments and Mechanistic Insights." *Molecular and cellular endocrinology* 335(1):2–13.
- Crossan, Gerry P. et al. 2011. "Disruption of Mouse Slx4, a Regulator of Structure-Specific Nucleases, Phenocopies Fanconi Anemia." *Nature genetics* 43(2):147–52.
- Currey, J. D. 1979. "Mechanical Properties of Bone Tissues with Greatly Differing Functions." *Journal of Biomechanics* 12(4):313–19.
- Currey, J. D. 1990. "Physical Characteristics Affecting the Tensile Failure Properties of Compact Bone." *Journal of Biomechanics* 23(8):837–44.
- Dallas, Sarah L., Matthew Prideaux, and Lynda F. Bonewald. 2013. "The Osteocyte: An Endocrine Cell ... and More." *Endocrine reviews* 34(5):658–90.
- Datta, H. K., W. F. Ng, J. A. Walker, S. P. Tuck, and S. S. Varanasi. 2008. "The Cell Biology of Bone Metabolism." *Journal of Clinical Pathology* 61(5):577–87.
- Day, Timothy F., Xizhi Guo, Lisa Garrett-Beal, and Yingzi Yang. 2005. "Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Mesenchymal Progenitors Controls Osteoblast and Chondrocyte Differentiation during Vertebrate Skeletogenesis." *Developmental Cell* 8(5):739–50.
- Demontiero, Oddom, Christopher Vidal, and Gustavo Duque. 2012. "Aging and Bone Loss: New Insights for the Clinician." *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease* 4(2):61–76.
- Diez, Begoña et al. 2017. "Therapeutic Gene Editing in CD34 + Hematopoietic Progenitors from Fanconi Anemia Patients." *EMBO Molecular Medicine* 9(11):1574–88.
- DiGirolamo, Douglas J., Douglas P. Kiel, and Karyn A. Esser. 2013. "Bone and Skeletal Muscle: Neighbors With Close Ties." *Journal of Bone and Mineral Research* 28(7):1509–18.

- Van Dijk, F. S. et al. 2011. "Osteogenesis Imperfecta: A Review with Clinical Examples." *Mol Syndromol* 2:1–20.
- Doherty, Mary Jo et al. 1998. "Vascular Pericytes Express Osteogenic Potential in Vitro and in Vivo." *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 13(5):828–38.
- Downey, Patricia A. and Michael I. Siegel. 2006. "Bone Biology and the Clinical Implications for Osteoporosis." *Physical therapy* 86(1):77–91.
- Ducy, P. 2000. "The Osteoblast: A Sophisticated Fibroblast under Central Surveillance." *Science* 289(5484):1501–4.
- Ducy, Patricia and Rui Zhang. 1997. "Osf2/Cbfa1: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation." *Cell* 89:747–54.
- Eaves, C. J. 2015. "Hematopoietic Stem Cells: Concepts, Definitions, and the New Reality." *Blood* 125(17):2605–13.
- Ebens, Christen L., Margaret L. MacMillan, and John E. Wagner. 2017. "Hematopoietic Cell Transplantation in Fanconi Anemia: Current Evidence, Challenges and Recommendations." *Expert Review of Hematology* 10(1):81–97.
- Eriksen, E. F. 1986. "Normal and Pathological Remodeling of Human Trabecular Bone: Three Dimensional Reconstruction of the Remodeling Sequence in Normals and in Metabolic Bone Disease." *Endocrine Reviews* 7(4):379–408.
- Eriksen, Erik Fink., Douglas W. Axelrod, and Flemming. Melsen. 1994. *Bone Histomorphometry*. Raven Press.
- Erlebacher, Adrian, Ellen H. Filvaroff, Stephen E. Gitelman, and Rik Derynck. 1995. "Toward a Molecular Understanding of Skeletal Development Review." *Cell* 80:371–78.
- Everts, V. et al. 2002. "The Bone Lining Cell: Its Role in Cleaning Howship's Lacunae and Initiating Bone Formation." *Journal of Bone and Mineral Research* 17(1):77–90.
- Fajardo-Orduña, Guadalupe R., Héctor Mayani, and Juan J. Montesinos. 2015. "Hematopoietic Support Capacity of Mesenchymal Stem Cells: Biology and Clinical Potential." *Archives of Medical Research* 46(8):589–96.
- Fakhry, Maya. 2013. "Molecular Mechanisms of Mesenchymal Stem Cell Differentiation towards Osteoblasts." *World Journal of Stem Cells* 5(4):136.
- Fanconi Anemia Research Fund. 2014. *Fanconi Anemia : Guidelines for Diagnosis and Management*.
- Fargo, John H. et al. 2014. "Comparison of Chromosome Breakage in Non-Mosaic and Mosaic Patients with Fanconi Anemia, Relatives, and Patients with Other Inherited Bone Marrow Failure Syndromes." *Cytogenetic and Genome Research* 144(1):15–27.

- Federico, Maria B., Paola Campodónico, Natalia S. Paviolo, and Vanesa Gottifredi. 2017. "Beyond Interstrand Crosslinks Repair: Contribution of FANCD2 and Other Fanconi Anemia Proteins to the Replication of DNA." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* (September).
- Feng, Xu and Jay M. McDonald. 2011. "Disorders of Bone Remodeling." *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 6(1):121–45.
- Ferrara, Napoleone et al. 1999. "VEGF Couples Hypertrophic Cartilage Remodeling, Ossification and Angiogenesis during Endochondral Bone Formation." *Nature Medicine* 5(6):623–28.
- Fleming, Heather E. et al. 2008. "Wnt Signaling in the Niche Enforces Hematopoietic Stem Cell Quiescence and Is Necessary to Preserve Self-Renewal In Vivo." *Cell Stem Cell* 2(3):274–83.
- Frame, Boy. 1971. "The Earlier Gain and the Later Loss of Cortical Bone in Nutritional Perspective." *Radiology* 98(2):310.
- Franz-Odenaal, Tamara A., Brian K. Hall, and P.Eckhard Witten. 2006. "Buried Alive: How Osteoblasts Become Osteocytes." *Developmental Dynamics* 235(1):176–90.
- Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhjan, and K. S. Lalykina. 1970. "The Development of Fibroblast Colonies in Monolayer Cultures of Guinea-Pig Bone Marrow and Spleen Cells." *Cell and tissue kinetics* 3(4):393–403.
- Frost, H. M. M. 1983. "The Skeletal Intermediary Organization." *Metabolic Bone Disease and Related Research* 4(5):281–90.
- Galán-Díez, Marta and Stavroula Kousteni. 2017. "The Osteoblastic Niche in Hematopoiesis and Hematological Myeloid Malignancies." *Current molecular biology reports* 3(2):53–62.
- Gangat, Naseema, Mrinal M. Patnaik, and Ayalew Tefferi. 2016. "Myelodysplastic Syndromes: Contemporary Review and How We Treat." *American Journal of Hematology* 91(1):76–89.
- Giri, Neelam, Dalia L. Batista, Blanche P. Alter, and Constantine A. Stratakis. 2007. "Endocrine Abnormalities in Patients with Fanconi Anemia." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92(7):2624–31.
- Glass, Donald A. et al. 2005. "Canonical Wnt Signaling in Differentiated Osteoblasts Controls Osteoclast Differentiation." *Developmental Cell* 8(5):751–64.
- Glimcher, M. J. 1987. "The Nature of the Mineral Component of Bone and the Mechanism of Calcification." *Instructional course lectures* 36:49–69.
- Gluckman, E. 2015. "Improving Survival for Fanconi Anemia Patients." *Blood* 125(24):3676–3676.

- Goldner, J. 1938. "A Modification of the Masson Trichrome Technique for Routine Laboratory Purposes." *The American journal of pathology* 14(2):237–43.
- Goldring, Mary B., Kaneyuki Tsuchimochi, and Kosei Ijiri. 2006. "The Control of Chondrogenesis." *Journal of Cellular Biochemistry* 97(1):33–44.
- Goldstein, S. A. 1987. "The Mechanical Properties of Trabecular Bone: Dependence on Anatomic Location and Function." *Journal of biomechanics* 20(11–12):1055–61.
- Greenbaum, A. M. and D. C. Link. 2011. "Mechanisms of G-CSF-Mediated Hematopoietic Stem and Progenitor Mobilization." *Leukemia* 25(2):211–17.
- Gueiderikh, Anna, Filippo Rosselli, and Januario B. C. Neto. 2017. "A Never-Ending Story: The Steadily Growing Family of the FA and FA-like Genes." *Genetics and Molecular Biology* 40(2):398–407.
- Guido Fanconi. 1927. "Familiäre Infantile Perniziosaartige Anämie (Perniziöses Blutbild Und Konstitution)." *Jahrb Kinderheilkd* 257–80.
- Gundberg, Caren M. 2003. "Matrix Proteins." *Osteoporosis International* 14(0):37–42.
- Hall, B. K. and T. Miyake. 1992. "The Membranous Skeleton: The Role of Cell Condensations in Vertebrate Skeletogenesis." *Anatomy and embryology* 186(2):107–24.
- Hall, Brian K. and T. Miyake. 2000. "All for One and One for All: Condensations and the Initiation of Skeletal Development." *BioEssays* 22(2):138–47.
- Haneline, L. S. et al. 1999. "Loss of FancC Function Results in Decreased Hematopoietic Stem Cell Repopulating Ability." *Blood* 94(1):1–8.
- Ho, Miriel S. H., Robert L. Medcalf, Stephen a. Livesey, and Kathy Traianedes. 2015. "The Dynamics of Adult Haematopoiesis in the Bone and Bone Marrow Environment." *British Journal of Haematology* 170(4):472–86.
- Houghtaling, Scott et al. 2003. "Epithelial Cancer in Fanconi Anemia Complementation Group D2 (Fancd2) Knockout Mice." *Genes & development* 17(16):2021–35.
- Huard, Caroline C. et al. 2013. "Fanconi Anemia Proteins Interact with CtBP1 and Modulate the Expression of the Wnt Antagonist Dickkopf-1." *Blood* 121(10):1729–39.
- Huard, Caroline C., Cédric S. Tremblay, Audrey Magron, Georges Lévesque, and Madeleine Carreau. 2014. "The Fanconi Anemia Pathway Has a Dual Function in Dickkopf-1 Transcriptional Repression." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(6):2152–57.
- Isenmann, Sandra et al. 2009. "TWIST Family of Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factors Mediate Human Mesenchymal Stem Cell Growth and Commitment." *Stem Cells* 27(10):2457–68.

- Jilka, Robert L., Robert S. Weinstein, Teresita Bellido, A. Michael Parfitt, and Stavros C. Manolagas. 1998. "Osteoblast Programmed Cell Death ( Apoptosis )." *Journal of Bone and Mineral Research* 13(5):793–802.
- Kamata, Mayumi et al. 2014. "GATA2 Regulates Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells." *Haematologica* 99(11):1686–96.
- Kamimae-Lanning, Ashley N., Natalya A. Goloviznina, and Peter Kurre. 2013. "Fetal Origins of Hematopoietic Failure in a Murine Model of Fanconi Anemia." *Blood* 121(11):2008–12.
- Karner, Courtney M. and Fanxin Long. 2017. "Glucose Metabolism in Bone." *Bone*.
- Karsenty, Gerard. 2003. "The Complexities of Skeletal Biology." *Nature* 423(6937):316–18.
- Khan, Nicholas E., Philip S. Rosenberg, and Blanche P. Alter. 2016. "Preemptive Bone Marrow Transplantation and Event-Free Survival in Fanconi Anemia." *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 22(10):1888–92.
- Kini, Usha and B. N. Nandeesh. 2012. "Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism." Pp. 29–57 in *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging*, vol. 9783642024. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Knies, Kerstin et al. 2017. "Biallelic Mutations in the Ubiquitin Ligase RFW3 Cause Fanconi Anemia." *Journal of Clinical Investigation* 127(8):3013–27.
- Knothe Tate, Melissa L. 2003. "Survey Whither Flows the Fluid in Bone?" An Osteocyte's Perspective." *Journal of Biomechanics* 36:1409–24.
- Komori, T. et al. 1997. "Targeted Disruption of Cbfa1 Results in a Complete Lack of Bone Formation Owing to Maturational Arrest of Osteoblasts." *Cell* 89(5):755–64.
- Komori, T. 2016. "Glucocorticoid Signaling and Bone Biology." *Hormone and Metabolic Research* 48(11):755–63.
- Komori, Toshihisa. 2009. "Regulation of Osteoblast Differentiation by Runx2." Pp. 43–49 in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 658.
- De Kouchkovsky, I. and M. Abdul-Hay. 2016. "Acute Myeloid Leukemia: A Comprehensive Review and 2016 Update'." *Blood cancer journal* 6(7):e441.
- Kovacs, Christopher S. 2011. "Bone Development in the Fetus and Neonate: Role of the Calcitropic Hormones." *Current Osteoporosis Reports* 9(4):274–83.
- Kronenberg, Henry M. 2003. "Developmental Regulation of the Growth Plate." *Nature* 423(6937):332–36.
- Kulak, Carolina A. Moreira, Victoria Z. Cochenski Borba, Jaime Kulak Júnior, and Melani Ribeiro Custódio. 2012. "Osteoporosis After Transplantation." *Current Osteoporosis Reports* 10(1):48–55.

- Kutler, David I. et al. 2003. "A 20-Year Perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR)." *Blood* 101(4):1249–56.
- Lacey, D. L. et al. 1998. "Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine That Regulates Osteoclast Differentiation and Activation." *Cell* 93(2):165–76.
- Landis, W. J. 1995. "The Strength of a Calcified Tissue Depends in Part on the Molecular Structure and Organization of Its Constituent Mineral Crystals in Their Organic Matrix." *Bone* 16(5):533–44.
- Lecourt, Séverine et al. 2010. "Bone Marrow Microenvironment in Fanconi Anemia: A Prospective Functional Study in a Cohort of Fanconi Anemia Patients." *Stem cells and development* 19(2):203–8.
- Lee, Hwa Jeen et al. 2012. "A Case Report of Fanconi Anemia Diagnosed by Genetic Testing Followed by Prenatal Diagnosis." *Annals of Laboratory Medicine* 32(5):380.
- Li, Y. et al. 2009. "Mesenchymal Stem/progenitor Cells Promote the Reconstitution of Exogenous Hematopoietic Stem Cells in Fancg<sup>-/-</sup> Mice in Vivo." *Blood* 113(10):2342–51.
- Lobitz, Stephan and Eunike Velleuer. 2006. "Guido Fanconi (1892-1979): A Jack of All Trades." *Nature reviews. Cancer* 6(11):893–98.
- Logan, Catriona Y. and Roel Nusse. 2004. "The Wnt Signaling Pathway in Development and Disease." *Annual review of cell and developmental biology* 20:781–810.
- Long, Fanxin. 2011. "Building Strong Bones: Molecular Regulation of the Osteoblast Lineage." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13(1):27–38.
- Long, Fanxin and David M. Ornitz. 2013. "Development of the Endochondral Skeleton." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5(1).
- MacDonald, Bryan T. 2004. "Hypomorphic Expression of Dkk1 in the Doubleridge Mouse: Dose Dependence and Compensatory Interactions with Lrp6." *Development* 131(11):2543–52.
- Mackie, E. J., Y. A. Ahmed, L. Tatarczuch, K. S. Chen, and M. Mirams. 2008. "Endochondral Ossification: How Cartilage Is Converted into Bone in the Developing Skeleton." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 40(1):46–62.
- MacMillan, Margaret L. and John E. Wagner. 2010. "Haematopoietic Cell Transplantation for Fanconi Anaemia - When and How?" *British Journal of Haematology* 149:14–21.
- Maes, Christa et al. 2002. "Impaired Angiogenesis and Endochondral Bone Formation in Mice Lacking the Vascular Endothelial Growth Factor Isoforms VEGF164 and VEGF188." *Mechanisms of Development* 111(1–2):61–73.

- Maes, Christa et al. 2010. "Osteoblast Precursors, but Not Mature Osteoblasts, Move into Developing and Fractured Bones along with Invading Blood Vessels." *Developmental Cell* 19(2):329–44.
- Mantelli, Melissa et al. 2015. "Comprehensive Characterization of Mesenchymal Stromal Cells from Patients with Fanconi Anaemia." *British Journal of Haematology* 170(6):826–36.
- Marie, P. J. and K. Kaabeche. 2006. "PPAR Gamma Activity and Control of Bone Mass in Skeletal Unloading." *PPAR Research* 2006:1–6.
- Martin, R. B. and J. Ishida. 1989. "The Relative Effects of Collagen Fiber Orientation, Porosity, Density, and Mineralization on Bone Strength." *Journal of biomechanics* 22(5):419–26.
- Matsumoto, Masahito et al. 2004. "Essential Role of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Cathepsin K Gene Expression during Osteoclastogenesis through Association of NFATc1 and PU.1." *Journal of Biological Chemistry* 279(44):45969–79.
- McClune, Brian L. and Navneet S. Majhail. 2013. "Osteoporosis after Stem Cell Transplantation." *Current Osteoporosis Reports* 11(4):305–10.
- Mcdonald, Michelle M. et al. 2017. "Homozygous Dkk1 Knockout Mice Exhibit High Bone Mass Phenotype Due to Increased Bone Formation." *Calcified Tissue International*.
- Meetei, Amom Ruhikanta et al. 2004. "X-Linked Inheritance of Fanconi Anemia Complementation Group B." *Nature Genetics* 36(11):1219–24.
- Mehta, Parinda A. and Jakub Tolar. 1993. *Fanconi Anemia*. University of Washington, Seattle.
- Miao, Dengshun, Bin He, Andrew C. Karaplis, and David Goltzman. 2002. "Parathyroid Hormone Is Essential for Normal Fetal Bone Formation." *Journal of Clinical Investigation* 109(9):1173–82.
- Michigami, Toshimi. 2013. "Regulatory Mechanisms for the Development of Growth Plate Cartilage." *Cellular and Molecular Life Sciences* 70(22):4213–21.
- Miller, S. C., L. de Saint-Georges, B. M. Bowman, and W. S. Jee. 1989. "Bone Lining Cells: Structure and Function." *Scanning microscopy* 3(3):953-60-1.
- Moore, Christine A. and Koyamangalath Krishnan. 2017. *Bone Marrow Failure*.
- Murshed, Monzur, Dympna Harmey, José Luis Millán, Marc D. McKee, and Gerard Karsenty. 2005. "Unique Coexpression in Osteoblasts of Broadly Expressed Genes Accounts for the Spatial Restriction of ECM Mineralization to Bone." *Genes and Development* 19(9):1093–1104.

- Mushtaq, T. 2002. "The Impact of Corticosteroids on Growth and Bone Health." *Archives of Disease in Childhood* 87(2):93–96.
- Nakashima, Kazuhisa et al. 2002. "The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation." *Cell* 108(1):17–29.
- Nakashima, Tomoki et al. 2011. "Evidence for Osteocyte Regulation of Bone Homeostasis through RANKL Expression." *Nature Medicine* 17(10):1231–34.
- Nicchia, Elena et al. 2015. "Clinical Aspects of Fanconi Anemia Individuals with the Same Mutation of FANCF Identified by next Generation Sequencing." *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology* 103(12):1003–10.
- Nie, Xuguang. 2005. "Dkk1, -2, and -3 Expression in Mouse Craniofacial Development." *Journal of Molecular Histology* 36(5):367–72.
- Niehrs, C. 2006. "Function and Biological Roles of the Dickkopf Family of Wnt Modulators." *Oncogene* 25(57):7469–81.
- Nuttall, M. 2004. "Controlling the Balance between Osteoblastogenesis and Adipogenesis and the Consequent Therapeutic Implications." *Current Opinion in Pharmacology* 4(3):290–94.
- Oftadeh, Ramin, Miguel Perez-Viloria, Juan C. Villa-Camacho, Ashkan Vaziri, and Ara Nazarian. 2015. "Biomechanics and Mechanobiology of Trabecular Bone: A Review." *Journal of Biomechanical Engineering* 137(1):10802.
- Okitsu, Yoko et al. 2007. "Regulation of Adipocyte Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells by Transcription Factor GATA-2." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 364(2):383–87.
- Ortega, Nathalie, Danielle J. Behonick, and Zena Werb. 2004. "Matrix Remodeling during Endochondral Ossification." *Trends in Cell Biology* 14(2):86–93.
- Palovcak, Anna, Wenjun Liu, Fenghua Yuan, and Yanbin Zhang. 2017. "Maintenance of Genome Stability by Fanconi Anemia Proteins." *Cell & Bioscience* 7(1):8.
- Peffault de Latour, R. et al. 2013. "Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Fanconi Anemia: The European Group for Blood and Marrow Transplantation Experience." *Blood* 122(26):4279–86.
- Petryk, Anna et al. 2006. "Prospective Study of Changes in Bone Mineral Density and Turnover in Children after Hematopoietic Cell Transplantation." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 91(3):899–905.
- Petryk, Anna, Lynda E. Polgreen, et al. 2015. "Bone Mineral Density in Children with Fanconi Anemia after Hematopoietic Cell Transplantation." *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 21(5):894–99.



- Petryk, Anna, Roopa Kanakatti Shankar, et al. 2015. "Endocrine Disorders in Fanconi Anemia: Recommendations for Screening and Treatment." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 100(3):803–11.
- Pittenger, M. F. 1999. "Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells." *Science* 284(5411):143–47.
- Poole, K. E. S. 2005. "Sclerostin Is a Delayed Secreted Product of Osteocytes That Inhibits Bone Formation." *The FASEB Journal*.
- Rahman, Md Shaifur, Naznin Akhtar, Hossen Mohammad Jamil, Rajat Suvra Banik, and Sikder M. Asaduzzaman. 2015. "TGF- $\beta$ /BMP Signaling and Other Molecular Events: Regulation of Osteoblastogenesis and Bone Formation." *Bone research* 3:15005.
- Renders, G. A. P., L. Mulder, L. J. van Ruijven, and T. M. G. J. van Eijden. 2007. "Porosity of Human Mandibular Condylar Bone." *Journal of Anatomy* 210(3):239–48.
- Robling, Alexander G., Alesha B. Castillo, and Charles H. Turner. 2006. "Biomechanical and Molecular Regulation of Bone Remodeling." *Annu. Rev. Biomed. Eng* 8:455–98.
- Rocheffort, G. Y., S. Pallu, and C. L. Benhamou. 2010. "Osteocyte: The Unrecognized Side of Bone Tissue." *Osteoporosis International* 21(9):1457–69.
- Rodríguez, Alfredo and Alan D'Andrea. 2017. "Fanconi Anemia Pathway." *Current Biology* 27(18):R986–88.
- Rose, Susan R. et al. 2011. "Bone Mineral Density Is Normal in Children with Fanconi Anemia." *Pediatric Blood & Cancer* 57(6):1034–38.
- Rose, Susan R. et al. 2012. "Endocrine Phenotype of Children and Adults with Fanconi Anemia." *Pediatric Blood & Cancer* 59(4):690–96.
- Rosenberg, Philip S. 2005. "Risk of Head and Neck Squamous Cell Cancer and Death in Patients with Fanconi Anemia Who Did and Did Not Receive Transplants." *Blood* 105(1):67–73.
- Rosenberg, Philip S., Hannah Tamary, and Blanche P. Alter. 2011. "How High Are Carrier Frequencies of Rare Recessive Syndromes? Contemporary Estimates for Fanconi Anemia in the United States and Israel." *American Journal of Medical Genetics, Part A* 155(8):1877–83.
- Rubin, Clinton T. and Lance E. Lanyon. 1987. "Osteoregulatory Nature of Mechanical Stimuli: Function as a Determinant for Adaptive Remodeling in Bone." *Journal of Orthopaedic Research* 5(2):300–310.
- Rutkovskiy, Arkady, Kåre-Olav Stensløyken, and Ingvar Jarle Vaage. 2016. "Osteoblast Differentiation at a Glance." *Medical Science Monitor Basic Research* 22:95–106.
- Safadi, Faye F. et al. 2009. "Bone Structure, Development and Bone Biology." Pp. 1–50 in *Bone Pathology*.

- Salazar, Valerie S., Laura W. Gamer, and Vicki Rosen. 2016. "BMP Signalling in Skeletal Development, Disease and Repair." *Nature Reviews Endocrinology* 12(4):203–21.
- Saltel, Frédéric, Olivier Destaing, Frédéric Bard, Diane Eichert, and Pierre Jurdic. 2004. "Apatite-Mediated Actin Dynamics in Resorbing Osteoclasts." *Molecular biology of the cell* 15(12):5231–41.
- Schuler, D., A. Kiss, and F. Fabian. 1969. "Chromosomal Peculiarities And 'in Vitro' examinations in Fanconi's Anaemia." *Human Genetics* 7(4):314–22.
- Semerad, Craig L., Fulu Liu, Alyssa D. Gregory, Katherine Stumpf, and Daniel C. Link. 2002. "G-CSF Is an Essential Regulator of Neutrophil Trafficking from the Bone Marrow to the Blood." *Immunity* 17(4):413–23.
- Shankar, Roopa Kanakatti et al. 2017. "Bone Mineral Density in Patients with Inherited Bone Marrow Failure Syndromes." *Pediatric Research* 82(3):458–64.
- Shimamura, Akiko and Blanche P. Alter. 2010. "Pathophysiology and Management of Inherited Bone Marrow Failure Syndromes." *Blood Reviews* 24(3):101–22.
- Silver, I. A., R. J. Murrills, and D. J. Etherington. 1988. "Microelectrode Studies on the Acid Microenvironment beneath Adherent Macrophages and Osteoclasts." *Experimental cell research* 175(2):266–76.
- Smeters, Stephanie E., Frans J. Smiers, Dorine Bresters, Martine C. Sonneveld, and Marc B. Bierings. 2016. "Four Decades of Stem Cell Transplantation for Fanconi Anaemia in the Netherlands." *British Journal of Haematology* 174(6):952–61.
- Sumpter, Rhea and Beth Levine. 2017. "Emerging Functions of the Fanconi Anemia Pathway at a Glance." *Journal of Cell Science* 130(16):2657–62.
- Szade, Krzysztof Tomasz et al. 2017. "Where Hematopoietic Stem Cells Live - the Bone Marrow Niche." *Antioxidants & Redox Signaling* ars.2017.7419.
- Taichman, Russell S. 2005. "Blood and Bone: Two Tissues Whose Fates Are Intertwined to Create the Hematopoietic Stem-Cell Niche." *Blood* 105(7):2631–39.
- Takada, Ichiro, Alexander P. Kouzmenko, and Shigeaki Kato. 2009. "Wnt and PPAR $\gamma$  Signaling in Osteoblastogenesis and Adipogenesis." *Nature Reviews Rheumatology* 5(8):442–47.
- Takahashi, N. et al. 1988. "Osteoclast-like Cell Formation and Its Regulation by Osteotropic Hormones in Mouse Bone Marrow Cultures." *Endocrinology* 122(4):1373–82.
- Teitelbaum, S. L. 2000. "Bone Resorption by Osteoclasts." *Science* 289(5484):1504–8.
- Thorogood, P. V and J. R. Hinchliffe. 1975. "An Analysis of the Condensation Process during Chondrogenesis in the Embryonic Chick Hind Limb." *Journal of embryology and experimental morphology* 33(3):581–606.

- Tontonoz, P., E. Hu, and B. M. Spiegelman. 1995. "Regulation of Adipocyte Gene Expression and Differentiation by Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma." *Current opinion in genetics & development* 5(5):571–76.
- Torzilli, P. A., K. Takebe, A. H. Burstein, J. M. Zika, and K. G. Heiple. 1982. "The Material Properties of Immature Bone." *Journal of Biomechanical Engineering* 104(1):12.
- Tríbulo, P. et al. 2017. "Consequences of Exposure of Embryos Produced in Vitro in a Serum-Containing Medium to Dickkopf-Related Protein 1 and Colony Stimulating Factor 2 on Blastocyst Yield, Pregnancy Rate, and Birth Weight." *Journal of Animal Science* 95(10):4407.
- Udagawa, Nobuyuki et al. 1990. "Origin of Osteoclasts: Mature Monocytes and Macrophages Are Capable of Differentiating into Osteoclasts under a Suitable Microenvironment Prepared by Bone Marrow-Derived Stromal Cells." *Cell Biology* 87:7260–64.
- Viguet-Carrin, S., P. Garnero, and P. D. Delmas. 2006. "The Role of Collagen in Bone Strength." *Osteoporosis International* 17(3):319–36.
- Wajnrajch, Michael P. et al. 2001. "Evaluation of Growth and Hormonal Status in Patients Referred to the International Fanconi Anemia Registry." *Pediatrics* 107(4):744–54.
- Walter, Dagmar et al. 2015. "Exit from Dormancy Provokes DNA-Damage-Induced Attrition in Haematopoietic Stem Cells." *Nature* 520(7548):549–52.
- Wang, Leo D. and Amy J. Wagers. 2011. "Dynamic Niches in the Origination and Differentiation of Haematopoietic Stem Cells." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12(10):643–55.
- Weber, Elin M., Bo Algers, Jan Hultgren, and I. Anna S. Olsson. 2013. "Pup Mortality in Laboratory Mice – Infanticide or Not?" *Acta Veterinaria Scandinavica* 55(1):83.
- Weitzmann, M. Neale and Ighovwerha Ofotokun. 2016. "Physiological and Pathophysiological Bone Turnover — Role of the Immune System." *Nature Reviews Endocrinology* 12(9):518–32.
- Willert, K. et al. 2003. "Wnt Proteins Are Lipid-Modified and Can Act as Stem Cell Growth Factors." *Nature* 423(6938):448–52.
- Wong, Jasmine C. Y. et al. 2003. "Targeted Disruption of Exons 1 to 6 of the Fanconi Anemia Group A Gene Leads to Growth Retardation, Strain-Specific Microphthalmia, Meiotic Defects and Primordial Germ Cell Hypoplasia." *Human Molecular Genetics* 12(16):2063–76.
- Xiong, Jinhu et al. 2011. "Matrix-Embedded Cells Control Osteoclast Formation." *Nature Medicine* 17(10):1235–41.
- Yeh, J. K., M. M. Chen, and J. F. Aloia. 1996. "Ovariectomy-Induced High Turnover in Cortical Bone Is Dependent on Pituitary Hormone in Rats." *Bone* 18(5):443–50.

- Yeh, W. C., Z. Cao, M. Classon, and S. L. McKnight. 1995. "Cascade Regulation of Terminal Adipocyte Differentiation by Three Members of the C/EBP Family of Leucine Zipper Proteins." *Genes & development* 9(2):168–81.
- Youssoufian, Hagop. 1994. "Localization of Fanconi Anemia C Protein to the Cytoplasm of Mammalian Cells (FACC Gene/subcellular location/DNA Repair)." *Genetics* 91:7975–79.
- Zhang, Qing-shuo. 2017. "Stem Cell Therapy for Fanconi Anemia." Pp. 1–10 in *Advances in Experimental Medicine and Biology*.
- Zhang, X. Z., D. N. Kalu, B. Erbas, J. L. Hopper, and E. Seeman. 1999. "The Effects of Gonadectomy on Bone Size, Mass, and Volumetric Density in Growing Rats Are Gender-, Site-, and Growth Hormone-Specific." *Journal of Bone and Mineral Research* 14(5):802–9.
- Zhou, Yuan et al. 2017. "An Abnormal Bone Marrow Microenvironment Contributes to Hematopoietic Dysfunction in Fanconi Anemia." *Haematologica* 102(6):1017–27.