



**HAL**  
open science

# Ostéoblastes et environnement physico-chimique : effets du contenu minéral matriciel et des micro-vibrations

Anthony Perrier

► **To cite this version:**

Anthony Perrier. Ostéoblastes et environnement physico-chimique : effets du contenu minéral matriciel et des micro-vibrations. Médecine humaine et pathologie. Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2010. Français. NNT : 2010STET004T . tel-00672348

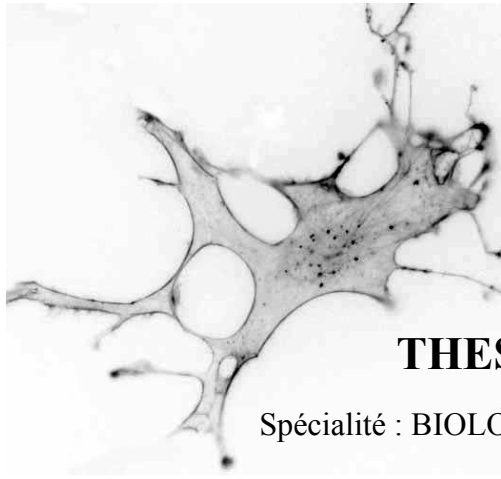
**HAL Id: tel-00672348**

**<https://theses.hal.science/tel-00672348>**

Submitted on 21 Feb 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



# **THESE DE DOCTORAT**

Spécialité : BIOLOGIE MOLECULAIRE et CELLULAIRE

Présentée par

**Anthony Perrier**

devant

L'UNIVERSITE JEAN MONNET, SAINT-ETIENNE

en vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT

## **Ostéoblaste et environnement physico-chimique: effets du degré de minéralisation et des micro-vibrations**

Soutenue publiquement le 25 mai 2010 devant le jury:

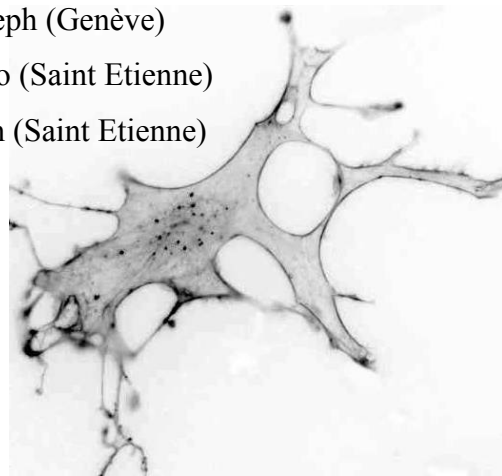
Rapporteur: Dr. Boivin Georges (Lyon)

Rapporteur: Dr. Nathalie Rochet (Nice)

Examineur: Dr. Caverzasio Joseph (Genève)

Directeur de thèse: Dr. Laurence Vico (Saint Etienne)

Co-encadrant: Dr. Alain Guignandon (Saint Etienne)



## REMERCIEMENTS

*Cette thèse fut une longue aventure, pleine de découvertes et d'émerveillements mais aussi pleine d'accros et de remises en question. Ces difficultés furent d'ailleurs finalement extrêmement formatrices. Ce travail de quatre années ne peut s'achever sans que je remercie les personnes y ayant participé de près ou de loin, physiquement ou moralement.*

*Je tiens tout d'abord à remercier les docteurs Georges Boivin, Nathalie Rochet et Joseph Caverzasio pour avoir accepté de juger ce travail.*

*Je tiens ensuite à adresser mes remerciements au Dr. Laurence Vico, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir fait confiance depuis le master recherche. J'étais venu au LBTO pour effectuer des travaux relatifs à la recherche spatiale, mais sachez que je ne suis aucunement frustré de n'avoir pu le faire, tellement les recherches que j'ai pu entreprendre m'ont passionnées. Votre porte de bureau, toujours ouverte, est à l'image de votre écoute. J'ai pu en effet vous parler à tout moment de mes problèmes (voire ceux des autres d'ailleurs...). D'après ce que j'ai pu voir autour de moi, ce n'est pas forcément le cas dans tous les labos et c'est une grande qualité.*

*J'exprime ma reconnaissance au Dr. Alain Guignandon, pour avoir encadré mon travail durant ces années de thèse. Je pense que tu as aussi subi les émerveillements et accros que je mentionne plus haut. Nos débuts furent difficiles, avec ce satané NO (qui possède un acronyme prédestiné aux choses négatives d'ailleurs...), qui nous avait plongé dans une spirale infernale. Quoiqu'il en soit, mes résultats nous auront réservés du début à la fin de multiples retournements de situations, chamboulant sans cesse nos hypothèses. Ceci aura eut un double impact: découragement dans un premier temps suivi d'idées iconoclastes, qui ne furent pas pour me déplaire, ni à toi je pense. La relation que nous avons établie est extrêmement plaisante, mélangeant sciences et humour.*

*Je remercierai ensuite les différents membres statutaires du LBTO; le Pr. Marie Hélène Lafage-Proust pour ses immenses connaissances, son humour et son humanité, le Dr. Luc Malaval pour son savoir et ses multiples références inconnues, mais tellement à propos, le Dr. Aline Rattner pour avoir encadré mon travail de master recherche et pour ses conseils quant aux marquages immunofluorescents, le Dr. Marie-Thérèse Linossier pour le travail de biologie moléculaire qu'elle a pu effectuer, Mireille Thomas pour avoir réussi à marquer cette vinculine sur ACC par transfection, Sylvie Peyroche pour sa bonne humeur permanente et pour m'avoir appris les différentes techniques de culture cellulaire (sans lesquelles je n'aurais pu rien faire), Norbert Laroche pour m'avoir formé à l'histomorphométrie lors de mon master recherche, Arnaud VanDenBossche pour son sérieux et son dévouement, ayant permis la mise en place des appareillages de vibration, désormais utiles à bon nombre de personnes, Chantal Roche pour sa compassion et son rire, résonnant dans le labo en emmenant une touche non négligeable de gaité. Je remercie également le Dr. Laurent Navarro, qui m'a fait prendre conscience qu'il fallait que je mette un peu les pieds dans la physique.*

## REMERCIEMENTS

*Je remercie les différents "étudiants-chercheurs", passé ou présent, avec lesquels de bons liens ont été tissés. Je commencerai par Carole et le Dr. Virginie Dumas, lesquelles ont acceptées de se plier quelques fois à mon "train-train" de synthèse des ACC, ont collaborées à mes manips et ont dû faire avec mon humour "Housien" durant ces quelques années dans le même bureau. Je n'oublierai pas non plus Marième, Rhonda, Fabrice, Maya, Valentin, Aline, Mohammed et Gabin. Guénaëlle, Marion, Dr. Cédric Lavet, nous nous sommes peu croisé dans le couloir du labo, mais vous ne resterez pas moins dans ma mémoire.*

*Je tiens aussi à réserver un paragraphe pour remercier les personnes ayant contribué aux moments de détente, nécessaires lors d'une thèse afin de ne pas perdre pied. Je commencerai par Alexis Vallard pour ces "Jeudis soir" de "zik" lors de la rédaction de cette thèse. Je n'oublierai pas ta gentillesse pour m'avoir ramené chez moi tous les soirs lorsque je n'avais plus de moyen de locomotion. Je continuerai en citant Bernard Roche. Tu m'auras permis, outre de rencontrer, à mon grand étonnement, l'ancien président des Giants de Saint Etienne, de faire de la musique devant un public, et je te remercie encore; C'était extrêmement plaisant bien qu'effrayant les premiers temps (beaucoup plus "gérable" avec Alexis), et je continuerai, je pense encore longtemps, à entendre le son de tes somptueuses altérations. Je remercie particulièrement Romain Saulnier, pour son cœur aussi grand que lui, sa compassion, sa compréhension. Saches que ces soirées musicales et ces discussions restent gravées. Dès ma venue à l'animalerie pour connaître le type qui faisait la musique que je venais d'entendre, j'ai su qu'on était sur la même longueur d'onde. Je remercierai aussi les Pr. en connerie, à savoir le Dr. Olivier C. Lapirot et le Dr. Laurent Nexon pour ces discussions HP2Besques...nan mais maintenant les gens ils remercient comme ça...alors qu'avant moins. Je remercie également mon frère pour les parties de "Madden 10" et les discussions au sujet de "Lost".*

*Je tiens enfin à remercier mes parents, pour avoir financé mes études et m'avoir toujours encouragé malgré mon pessimisme incessant (mais je me soigne) et autres difficultés tout au long de mon cursus. Magalie, tu as dû supporter mes humeurs durant cette thèse, particulièrement durant sa rédaction. Malgré cela, ton soutien fut sans faille. Maintenant que la fin de ce doctorat approche, les choses vont enfin pouvoir se dérouler comme nous le rêvons depuis longtemps...merci à toi.*

## SOMMAIRE

<i>LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX</i> .....	<i>i</i>
<i>ABREVIATIONS COURAMMENT UTILISEES</i> .....	<i>iii</i>
<b>A. INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>B. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>4</b>
<b>Chapitre I. Du tissu osseux à ses cellules</b> .....	<b>5</b>
<b>1. Le tissu osseux: un organe remodelé</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1. Structure osseuse</b> .....	<b>5</b>
1.1.1. La matrice extracellulaire .....	6
1.1.1.1. La phase organique.....	6
1.1.1.2. La phase minérale.....	9
1.1.1.3. Différents types d'os - le cortical et le trabéculaire .....	10
1.1.2. Les cellules osseuses .....	12
1.1.2.1. Les cellules ostéoblastiques .....	13
1.1.2.1.1. Les ostéoblastes.....	14
1.1.2.1.2. Les cellules bordantes .....	15
1.1.2.1.3. Les ostéocytes .....	16
1.1.2.2. Les cellules ostéoclastiques.....	17
<b>1.2. Le remodelage osseux</b> .....	<b>20</b>
1.2.1. Les différentes phases.....	21
1.2.2. Différents remodelages selon le compartiment osseux.....	25
<b>2. Interactions matrice-cellules osseuses</b> .....	<b>26</b>
<b>2.1. Les matériaux mimétiques de l'os</b> .....	<b>26</b>
<b>2.2. Ostéoblaste et matrice</b> .....	<b>31</b>
2.2.1. Effets des caractéristiques physiques de surface .....	31
2.2.2. Effets de l'apatite .....	33
<b>2.3. Cellules souches mésenchymateuses et matrice</b> .....	<b>35</b>
<b>Chapitre II. Aspects mécaniques de la cellule au tissu osseux</b> 37	
<b>1. La cellule: un centre d'intégration mécanique</b> .....	<b>37</b>
<b>1.1. La mécanique cellulaire</b> .....	<b>37</b>
1.1.1. Le cytosquelette .....	37
1.1.1.1. Les microfilaments.....	38
1.1.1.2. Les microtubules.....	41
1.1.2. La migration cellulaire.....	43
1.1.3. L'adhésion cellulaire.....	48
1.1.3.1. Les intégrines .....	48
1.1.3.2. Les plaques d'adhésion .....	51
1.1.4. La tenségrité .....	53
1.1.5. La théorie du "clutch" = théorie de l'embrayage.....	57
<b>1.2. La mécano-traduction</b> .....	<b>61</b>
<b>1.3. Les marqueurs de mécano-sensibilité</b> .....	<b>66</b>
<b>1.4. Le mécanostat</b> .....	<b>69</b>
<b>2. Vers de nouveaux signaux mécaniques</b> .....	<b>72</b>
<b>2.1. Quelques notions physiques</b> .....	<b>73</b>

<b>2.2. Des stimulations de hautes amplitudes et de basses fréquences (ha/bf)</b> .....	<b>74</b>
2.2.1. A l'échelle tissulaire .....	74
2.2.2. A l'échelle cellulaire .....	75
2.2.2.1. Cellules ostéoblastiques .....	76
2.2.1.2. Cellules ostéoclastiques .....	77
<b>2.3. Aux stimulations de basses amplitudes et de hautes fréquences (ba/hf) – les micro-vibrations (adapté de la revue (Vico et al., 2008))</b> .....	<b>78</b>
2.3.1. A l'échelle tissulaire .....	79
2.3.2. A l'échelle cellulaire .....	81
2.3.3. Effets sur d'autres systèmes .....	82
<b>2.4. A la recherche du déterminant mécanique de la réponse osseuse</b> .....	<b>84</b>
<b>2.5. Hautes ou basses amplitudes...Un paradoxe</b> .....	<b>86</b>
<b>C. OBJECTIFS</b> .....	<b>87</b>
<b>D. RESULTATS ET DISCUSSION</b> .....	<b>89</b>
<i>Chapitre I. Le degré de minéralisation du collagène augmente de façon dose-dépendante le dépôt d'une matrice similaire à une ligne cémentante par des cellules pré-ostéoblastiques (Article I).</i> .....	<i>90</i>
<i>Présentation de l'Article I:</i> .....	<i>90</i>
<i>Article I:</i> .....	<i>90</i>
<i>Principaux résultats/discussion de l'Article I:</i> .....	<i>112</i>
<i>Chapitre II. La décontraction cellulaire de cellules ostéoblastiques cultivées sur des supports ostéo-mimétiques stimule leur machinerie de mécano-sensation (Papier II).</i> .....	<i>114</i>
<i>Présentation de l'Article II:</i> .....	<i>114</i>
<i>Article II:</i> .....	<i>114</i>
<i>Principaux résultats/discussion de l'Article II:</i> .....	<i>136</i>
<i>Résultats complémentaires à l'Article II:</i> .....	<i>137</i>
<i>Chapitre III. Effets des micro-vibrations sur les pré-ostéoblastes en fonction du degré de minéralisation du collagène.</i> .....	<i>139</i>
<i>Présentation:</i> .....	<i>139</i>
<i>Résultats/discussion:</i> .....	<i>139</i>
<b>E. DISCUSSION GENERALE &amp; PERSPECTIVES</b> .....	<b>145</b>
<b>F. CONCLUSION</b> .....	<b>153</b>
<b>G. MATERIELS &amp; METHODES</b> .....	<b>157</b>
<b>H. REFERENCES</b> .....	<b>163</b>
<b>ANNEXES</b> .....	<b>203</b>

## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1: Localisation et structure des différents types osseux: le cortical et le trabéculaire. .	11
Figure 2: La moelle osseuse renferme les progéniteurs des cellules osseuses. ....	12
Figure 3: Différenciation ostéoblastique. ....	14
Figure 4: Diagramme représentant les trois grandes étapes de la vie de l'ostéoblaste (exemple des MC3T3-E1, lignée pré-ostéoblastique murine immortalisée capable de se différencier en ostéoblaste minéralisant). ....	15
Figure 5: Morphologie de l'ostéocyte. ....	17
Figure 6: Différenciation ostéoclastique. ....	18
Figure 7: Schéma d'un ostéoclaste mature. ....	19
Figure 8: Facteurs influant sur l'homéostasie osseuse. ....	20
Figure 9: Le remodelage osseux. ....	24
Figure 10: Remodelage ostéonal et héli-ostéonal des compartiments osseux corticaux et trabéculaires. ....	26
Figure 11: Evolution de l'utilisation des biomatériaux dans les greffes osseuses. ....	27
Figure 12: Nucléation et élongation de l'actine. ....	38
Figure 13: Mécanisme de "treadmilling" de l'actine. ....	39
Figure 14: Représentation schématique de la myosine II. ....	40
Figure 15: Voies principales de phosphorylation de la chaîne légère régulatrice de la myosine (20kDa) ou MLC2. ....	41
Figure 16: Représentation d'un microtubule. ....	42
Figure 17: Les différentes étapes de la migration cellulaire et les différentes protrusions. ....	45
Figure 18: Directionnalité de la cellule. ....	47
Figure 19: Définition du type de migration suivant la localisation des lamellipodes. ....	48
Figure 20: Représentation schématique d'une intégrine. ....	49
Figure 21: La famille des intégrines et une partie de leurs ligands. ....	49
Figure 22: Signalisation "outside-in" des intégrines grâce à des molécules partenaires. ....	50
Figure 23: Le réseau formé au sein des plaques d'adhésion. ....	51
Figure 24: Evolution des plaques d'adhésion cellulaires. ....	52
Figure 25: Composition moléculaire des plaques d'adhésion. ....	53
Figure 26: Sculpture de Kenneth Snelson: "Triple crown" (à gauche) et grossissement d'une sculpture (à droite). ....	54
Figure 27: Le cytosquelette est un modèle de tensegrité. ....	55
Figure 28: Schéma de l'articulation du genou (à gauche) et sa simplification (à droite), montrant les forces en jeu dans l'os, les cartilages et les ligaments. ....	57
Figure 29: L'hypothèse du "clutch". ....	58
Figure 30: "Clutch" et remodelage de la matrice. ....	59
Figure 31: Le "clutch" selon l'état matriciel. ....	60
Figure 32: Les contraintes mécaniques reçues par la cellule osseuse dans son micro-environnement. ....	61
Figure 33: Les mécano-senseurs cellulaires. ....	63
Figure 34: Transmission des forces de la MEC aux molécules de signalisation à l'intérieur de la cellule. ....	63
Figure 35: Les voies de mécano-traduction des cellules ostéoblastiques. ....	64
Figure 36: Les adhésions focales engagées dans un "clutch" permettent la transmission de l'information. ....	65
Figure 37; De l'appréhension de la surface à la réponse cellulaire. ....	66
Figure 38; Le mécanostat. ....	70

Figure 39: Ajustement de la masse et de l'architecture osseuse par les contraintes mécaniques. ....	71
Figure 40: Relations entre le niveau de contrainte et l'apoptose des ostéocytes (/mm <sup>2</sup> ) dans la zone corticale osseuse – Parallèle ave le mécanostat. ....	72
Figure 41: Effet des micro-vibrations sur différents systèmes et relations existantes entre ces systèmes. ....	83
Figure 42: Le taux de contrainte ou "strain rate" serait un paramètre physique important de la réponse osseuse. ....	84
Figure 43: Régulation supposée améliorée de la masse osseuse par l'amplitude des contraintes ....	85
Figure 44: Morphologie des cellules C3H10T1/2 après 32h de culture sur un support de collagène de type I, ACC0 et un support de collagène de type I complexé à 50% d'apatite, ACC50. ....	137
Figure 45: Différenciation des cellules souches mésenchymateuses C3H10T1/2 sur ACC50. ....	138
Figure 46: Effet des stimulations ba/hf sur la production de NO par les cellules ostéoblastiques MC3T3-E1. ....	140
Figure 47: Relargage de nitrite par les supports de culture minéralisés. ....	141
Figure 48: Morphologie des cellules MC3T3-E1 mises en présence d'ACC50 solubilisé à différents temps après l'ensemencement. ....	142
Figure 49: Signature génique de la lignée MC3T3-E1 après 32h de culture sur différents matériaux. ....	143
Figure 50: Modulations géniques après stimulations vibratoires de 5 min (le nombre indique la démultiplication par rapport au support de même type, non stimulé). ....	143
Figure 51: Schéma de fonctionnement simplifié de l'appareillage de vibration. ....	161
Figure 52: Principe du dosage Griess. ....	162
Tableau 1: Protéines non collagéniques présentes dans le tissu osseux, et leur concentration en % approximatif du poids total des protéines non collagéniques. ....	8
Tableau 2: Matériaux utilisés en chirurgie orthopédique. ....	29
Tableau 3; Différentes modalités de contraintes utilisées pour les dosages de NO. ....	160



## ABREVIATIONS COURAMMENT UTILISEES

ABP: Actin Binding Protein (protéine liant l'actine).  
ACC: Apatite Collagen Complex (complexes apatite-collagène).  
ACC0: boîte de 35mm de diamètre recouverte de collagène complexé à 0% d'apatite.  
ACC25: boîte de 35mm de diamètre recouverte de collagène complexé à 25% d'apatite.  
ACC50: boîte de 35mm de diamètre recouverte de collagène complexé à 50% d'apatite.  
ATP: Adenosine Triphosphate.  
ba/hf: stimulations de basses amplitudes et de hautes fréquences.  
BMU: Bone Multicellular Unit (unité multicellulaire osseuse).  
BRC: Bone Remodeling Compartment (compartiment de remodelage osseux).  
BSP: Bone SialoProtein (sialoprotéine osseuse).  
BSU: Bone Structural Unit (unité de structure osseuse).  
d.o.m.: degré de minéralisation.  
FA: Focal Adhesion (adhésion focale).  
FB: Fibrillar Adhesion (adhésion fibrillaire).  
FN: Fibronectine.  
FX: Focal Complex (complexe focal).  
g: gravité ( $1g=9.81 \text{ m.s}^{-2}$ ) (unité d'accélération).  
GTPase: Guanosine TriPhosphatase .  
ha/bf: stimulations de hautes amplitudes et de basses fréquences.  
HAP: HydroxyAPatite.  
Hz: Hertz (unité de fréquence).  
M-CSF: Macrophage Colony Stimulating Growth Factor.  
MEC: Matrice Extra-Cellulaire.  
MLC: Myosin Light Chain (Chaîne légère de la myosine).  
MLC2: Myosin Light Chain 2=Chaîne légère régulatrice de la myosine de type II  
MLCK: Myosin Light Chain Kinase  
NO: Nitric Oxide (oxyde nitrique).  
OPG: OstéoProtéGérine.  
OPN: OstéoPontiNe.  
PNC: Protéines Non Collagéniques.  
PTH: Parathyroid hormone (hormone parathyroïdienne).  
RANK: Receptor Activator of Nuclear factor  $\kappa$ b.  
RANKL: Receptor Activator of Nuclear factor  $\kappa$ b Ligand.  
RGD: Arginine-Glycine-Aspartate.  
ROCK: RhO Kinase  
TCPS: Tissue Culture PolyStyrene.  
VEGF-A: Vascular Endothelial Growth Factor.  
 $\epsilon$ : strain (unité de déformation).

# A. INTRODUCTION

Le tissu osseux se caractérise par sa capacité de renouvellement permanent à l'âge adulte, lui permettant de faire face aux besoins métaboliques et mécaniques de l'organisme, en remplaçant localement des fractions d'os ancien par de l'os nouvellement formé. L'apport métabolique du tissu osseux à l'organisme vient d'une autre de ses caractéristiques, la minéralisation de sa matrice organique (le matériau osseux est par conséquent biphasique). Ainsi, selon les besoins, le tissu osseux peut relarguer ou stocker les composants de son minéral, que sont le calcium et le phosphore, essentiels au métabolisme. La demande mécanique est assouvie grâce à une structure osseuse adaptable, permettant d'apporter à l'organisme la protection de ses organes, la locomotion grâce aux attaches musculotendineuses, et son soutien face à la gravité terrestre et aux contraintes mécaniques environnementales, de manière appropriée. La majorité de ces contraintes ont été montrées comme étant de faibles amplitudes se répétant à un rythme élevé, ce qui peut facilement être conceptualisé comme des vibrations.

Ce matériau biphasique accomplit son remodelage permanent et essentiel à l'organisme grâce à l'activité coordonnée dans l'espace et dans le temps des cellules adhérentes qui le constituent. La composition du matériau osseux étant modifiée au cours du remodelage, ces cellules se voient confrontées à différentes matrices extracellulaires (MEC), notamment dans leur contenu en minéral. Ce dernier a été montré comme ayant un impact direct sur la morphologie et l'activité des cellules osseuses. La relation existant entre le matériau et la cellule osseuse apparaît ainsi primordiale pour son fonctionnement propre mais aussi pour celui des autres cellules impliquées dans le remodelage. L'étude *in vitro* est essentielle à la compréhension unitaire des phénomènes biologiques, les cellules étant ainsi mises hors de toute régulation systémique. Mais dans ce type d'études, la relation que la cellule établit avec son environnement naturel est souvent omise. En effet, la majorité des expérimentations menées *in vitro* se déroulent sur des boîtes de cultures composées de polystyrène traité afin de faciliter l'adhérence cellulaire, ce qui constitue, pour des cellules adhérentes, une des principales limitations de ces études. Afin d'étudier le comportement des cellules osseuses dans un environnement mimant le tissu osseux, il faut disposer d'un substratum d'étude biphasique dont le contenu en minéral puisse être variable.

Par ailleurs, afin de permettre l'adaptation mécanique du tissu osseux, les cellules osseuses sont capables d'intégrer et d'adapter leurs réponses en fonction des informations mécaniques environnementales perçues dans un phénomène appelé mécano-traduction, sous dépendance de la signalisation des intégrines et de la dynamique du cytosquelette. Si le tissu osseux est ainsi en renouvellement permanent en fonction de la demande mécanique, il se va de

## A. INTRODUCTION

concevoir que les vibrations, signaux osseux prépondérants, puissent avoir un effet, au moins de stabilisation, sur la qualité et la quantité du tissu osseux, et donc sur l'activité des cellules osseuses.

Dans ce contexte où le matériau osseux varie dans son degré de minéralisation et dans l'intégrité de son collagène durant son activité de remodelage, on remarque que les types cellulaires confrontés à ces substrats changent de morphologies et ont des activités très différentes. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que les variations du contenu minéral de matériaux mimétiques de l'os pourraient moduler la capacité de mécano-traduction des ostéoblastes, et en particulier moduler les réponses cellulaires selon la fréquence des signaux mécaniques imposés. Partant de cette hypothèse, nous introduirons différents chapitre de bibliographie qui permettront de faire un point sur :

- Les différentes matrices rencontrées au cours du remodelage osseux et l'influence du support de culture sur le comportement des cellules osseuses.
- Les structures impliquées dans la mécano-traduction et l'effet des contraintes mécaniques, particulièrement des micro-vibrations, au niveau tissulaire et cellulaire.

Puis nous présenterons nos résultats en trois parties:

- Relation cellule ostéoblastique-matrice ostéo-mimétique variant dans le degré de minéralisation de son collagène de type I, recréant les phases du remodelage osseux.
- Modification des capacités de mécano-traduction des cellules ostéoblastiques cultivées sur matériaux ostéo-mimétiques et différenciation de cellules souches mésenchymateuses sur ces matériaux.
- Effet des micro-vibrations sur les cellules ostéoblastiques en environnement ostéo-mimétique.

B. REVUE  
BIBLIOGRAPHIQUE

## **Chapitre I. Du tissu osseux à ses cellules**

### **1. Le tissu osseux: un organe remodelé**

L'os, tissu conjonctif spécialisé constituant l'endosquelette des vertébrés, joue un rôle :

- métabolique dans le maintien de l'équilibre phosphocalcique : en effet notre squelette renferme 99% du calcium et 90% du phosphore de l'organisme, qui jouent un rôle biologique prépondérant dans la vie cellulaire, la transmission nerveuse et la coagulation sanguine.
- hématopoïétique, la moelle osseuse située au sein de l'os contenant les cellules hématopoïétiques; c'est le lieu de fabrication des cellules sanguines.
- mécanique dans la protection des organes vitaux qu'il procure et dans le soutien de l'organisme. Le système nerveux central est en effet protégé par la boîte crânienne et les vertèbres, tandis que le cœur et les poumons le sont grâce à la cage thoracique. Le rôle de soutien du tissu osseux est assuré à la fois par sa solidité et sa résistance, mais aussi, dans une certaine mesure, par son élasticité. Ces caractéristiques physiques sont étroitement liées à la nature, à la structure ou à l'association des différents éléments qui compose les os. Les propriétés mécaniques du tissu osseux lui permettent de supporter les effets de la pesanteur (la plupart des animaux terrestres s'affaîsseraient sous leur propre poids s'ils n'avaient pas de squelette pour soutenir leurs tissus mous), de résister aux contraintes mécaniques externes et de résister également aux forces de contraction musculaires aux attaches tendineuses, permettant ainsi de générer le mouvement, autre rôle mécanique joué par le tissu osseux.

Ces différents rôles sont assurés tout au long de la vie grâce à la capacité du tissu osseux à se remodeler selon les besoins de l'organisme et les exigences environnementales, en retirant des fractions de matrice osseuse devenues métaboliquement ou mécaniquement inadaptées et en les remplaçant par des fractions capables de remplir ces rôles à nouveau.

#### **1.1. Structure osseuse**

Divers types osseux peuvent être observés dans un squelette de vertébré supérieur sur le plan anatomique: les os courts (os du carpe, os du tarse), les os plats (omoplates, crâne) et les os longs (humérus, fémur). Ces os sont, au cours de leur croissance, tout d'abord composés de tissu osseux primaire (os tissé ou fibreux appelé "woven bone"), remplacé par la suite par du tissu osseux secondaire (os lamellaire), à l'organisation plus élaborée. Ce tissu osseux

lamellaire peut alors prendre deux formes structurales: l'os cortical (ou compact) et l'os trabéculaire (ou spongieux). Chacun de ces types d'os a une répartition topographique spécifique (cf. B. Chapitre I-1.1.1.3. Différents types d'os - le cortical et le trabéculaire) mais ils ont en commun les constituants de leur MEC, formée d'une phase organique et d'une phase minérale caractéristique, ainsi que les cellules synthétisant et érodant cette matrice dans l'activité de remodelage osseux. Deux membranes de tissus conjonctifs délimitent de plus le tissu osseux: le périoste, situé à la périphérie de l'os, servant d'ancrage aux ligaments et tendons et servant de géniteur de cellules osseuses, assurant ainsi la croissance de l'os en épaisseur, et l'endoste, tapissant les parois de toutes les cavités vascularisées du tissu osseux et renfermant également des cellules osseuses, assurant donc, lui aussi, la croissance de l'os en épaisseur.

### 1.1.1. La matrice extracellulaire

#### 1.1.1.1. *La phase organique*

Elle représente 30% de la masse osseuse. Les composants de cette phase sont déposés majoritairement par les ostéoblastes au cours de la phase active de leur existence. Parmi les premiers composants déposés au cours de l'ossification primaire, se trouvent la fibronectine, dont le réseau servira de moule à la mise en place ultérieure des molécules de collagène (Leiss et al., 2008; Mao and Schwarzbauer, 2005a). Sont aussi déposés à ces stades précoces d'autres molécules matricielles comme la ténascine (Mackie and Tucker, 1992) et le réseau des fibrillines (Kitahama et al., 2000). C'est sur cette matrice primaire que sera alors déposé un réseau de fibres de collagène, essentiellement de type I. Cette protéine constitue la majorité des protéines de la phase organique osseuse (90%) et c'est l'organisation des fibres de collagène de type I qui donnera son caractère tissé ou lamellaire au tissu osseux. Si les fibres de collagène sont largement désorganisées, on sera en présence de tissu osseux tissé, immature et peu résistant, présent chez l'enfant, lors de la réparation des fractures et lors de pathologies comme la maladie de Paget. Si, au contraire, les fibres sont organisées parallèlement, on sera en présence de tissu osseux lamellaire, mature et résistant. Les fibres de collagène de type I confèrent à l'os sa résistance à l'étirement. Il est à noter que la liaison de l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  (cf. B. Chapitre II-1.1.3.1. Les intégrines) des ostéoblastes au collagène de type I générera des signaux stimulant l'expression de Runx2, facteur de transcription

déterminant pour la différenciation terminale des ostéoblastes (Franceschi et al., 2003; Jikko et al., 1999; Xiao et al., 1998).

Le collagène est une glycoprotéine fibreuse, rigide, formant une triple hélice d'une longueur de 3000Å et de 50Å de diamètre, riche en proline et hydroxyproline (on y trouve en fait une répétition du motif Gly-X-Y, où un tiers des X sont des prolines et un tiers des Y sont des hydroxyprolines). Le collagène est synthétisé sous la forme de tropocollagène constitué de trois sous unités. Cinq molécules de tropocollagène sont ensuite agencées en microfibrilles ordonnées séquentiellement en longueur avec une période de 640Å. Une fibrille est ensuite constituée par l'assemblage régulier de microfibrilles de 100 à 300Å de diamètre visible au microscope électronique sous la forme d'une alternance de bandes sombres et de bandes claires.

La fraction organique de la matrice osseuse est en fait caractérisée par ses éléments non collagéniques. Il existe en effet plusieurs protéines non collagéniques (PNC), constituant la substance fondamentale du tissu osseux mature, représentant ainsi de 10 à 15% du contenu protéique osseux. Ces protéines ont un rôle essentiel sur le plan fonctionnel, du fait de leur participation à l'organisation macromoléculaire du tissu osseux, mais aussi parce qu'elles pourraient intervenir dans de nombreux aspects encore obscurs de la physiologie osseuse comme les mécanismes de la minéralisation, le chimiotactisme cellulaire ou encore les phénomènes de couplage entre résorption et formation osseuses. On peut les classer en trois groupes:

- Les PNC osseuses proprement dites, quantitativement les plus importantes, qui font partie intégrante de la matrice osseuse. Certaines sont spécifiques du tissu osseux comme l'ostéocalcine.
- Les protéines plasmatiques, synthétisées dans d'autres organes et qui s'accumulent dans l'os à partir du plasma et des liquides interstitiels. L' $\alpha$ 2-HS glycoprotéine (fétuine) et l'albumine sont les plus abondantes de ces protéines adsorbées par l'os.
- Les facteurs de croissance dont certains ont pu être isolés dans la matrice osseuse, comme le TGF- $\beta$ . Beaucoup d'autres sont synthétisés par les ostéoblastes (IGF (Insulin-like Growth Factor), BMP (Bone Morphogenic Protein), PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), etc.).

Nous citerons ici quelques PNC osseuses (Tableau 1), comme l'ostéonectine, ou SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteins), qui présente une grande affinité pour le collagène de type I et le calcium (Termine et al., 1981) et est un modulateur de l'adhésion



cellulaire (Murphy-Ullrich, 2001), et l'ostéocalcine ou BGP (Bone Gla-Protein), exprimée par les ostéoblastes en différenciation terminale (cette protéine constitue ainsi le marqueur phénotypique le plus spécifique des cellules ostéo-formatrices, d'autant plus qu'elle est dosable dans le sang (Brown et al., 1984)). Si le gène de l'ostéocalcine est éteint, une augmentation de la formation osseuse se produit, laissant supposer de son rôle inhibiteur sur cette formation (Wolf, 1996). Ces deux dernières PNC sont les plus abondantes dans le tissu osseux. Nous trouvons aussi la famille des SIBLINGS (Small Integrin Binding N-linked Glycoproteins) qui contient notamment l'ostéopontine (OPN), montrée comme ayant un rôle anti minéralisant (Hunter et al., 1996; McKee and Nanci, 1996), et la sialoprotéine osseuse (BSP), montrée comme pro minéralisante (Gordon et al., 2007; Hunter et al., 1996). Citons également la MGP (Matrix Gla-Protein), protéine apparentée à l'ostéocalcine dont le rôle anti-minéralisant a clairement été établi par l'extinction de son gène (Luo et al., 1997). On trouve par ailleurs des protéoglycannes, qui sont des glycoprotéines auxquelles sont rattachées une ou plusieurs chaînes polysaccharidiques (glycosaminoglycannes), formant des éléments fondamentaux de la MEC. Parmi les protéoglycannes matriciels, la famille des SLRP (Small Leucin Rich Proteoglycans), dont font partie la décorine et le biglycane, joue un rôle dans l'organisation des molécules de collagène (Corsi et al., 2002).

**Tableau 1: Protéines non collagéniques présentes dans le tissu osseux, et leur concentration en % approximatif du poids total des protéines non collagéniques.**

<b>PROTEINES COLLAGENIQUES OSSEUSES</b>	
Ostéonectine (SPARC)	15-25%
Ostéocalcine (Bone Gla protein, BGP)	15-25%
SIBLINGS	10%
Matrix Gla Protein (MGP)	2%
Protéoglycannes	4%
Phosphoprotéines	9%
<b>PROTEINES PLASMATIQUES</b>	
$\alpha$ 2-HS glycoprotéine (fêtuine)	5-10%
Albumine	3%
Immunoglobulines	<1%
Autres	20-30%
<b>FACTEURS DE CROISSANCE</b>	
	<1%

Cette phase organique est ainsi formée d'éléments collagéniques et non collagéniques interagissant les uns avec les autres dans des régulations complexes afin de former l'ostéoïde, matrice qui sera ensuite minéralisée.

### 1.1.1.2. *La phase minérale*

Elle représente 70% de la masse osseuse. Le processus de minéralisation est établi par les ostéoblastes en différenciation terminale et les chondrocytes hypertrophiques. Ces cellules vont minéraliser la matrice organique à des moments et des emplacements précis, le processus de minéralisation primaire commençant une dizaine de jours après le dépôt de l'ostéoïde (Hill, 1998). Les composants minéraux déposés sont principalement des sels de calcium et des phosphates présents sous forme de cristaux d'hydroxyapatite (HAP), déposés le long des fibres de collagène ou à l'intérieur de celles-ci, sous forme de plaques ou d'aiguilles. Les apatites sont des composites isomorphes qui cristallisent dans le système hexagonal, de formule générale  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{X})$ , X pouvant être du chlore (Chlorapatite), du fluor (Fluorapatite) ou un groupe hydroxyl. Ce dernier cas est celui de l'HAP, dont la formule est  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ , usuellement écrite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  pour souligner le fait que la maille de la structure cristalline comprend deux molécules (HAP, rapport Ca/P = 1,67) (Posner, 1985).

Deux mécanismes sont établis quant à la formation de ces cristaux. Le premier fait intervenir des vésicules cellulaires excrétées (Anderson, 1995; Thouverey et al., 2009). Ces vésicules contiennent des minéraux phospho-calciques amorphes formés par association (Wu et al., 1995) du phosphate inorganique cytoplasmique (Wuthier et al., 1977) et du calcium mitochondrial (Brighton and Hunt, 1976). Les complexes phospho-calciques mûrissent ensuite en HAP par association avec certains composants lipidiques des vésicules (Wuthier, 1975). Enfin, la membrane des vésicules est rompue par des phospholipases (Balcerzak et al., 2006) et par la croissance des cristaux, permettant la libération de l'HAP dans la MEC. Le deuxième mécanisme considère la nucléation des cristaux entre les molécules de collagène (Landis et al., 1996), au niveau de résidus spécifiques (Landis and Silver, 2009), régulée par les PNC associées (Glimcher, 1989) (cf. B. Chapitre I-1.1.1.1. La phase organique).

Quoiqu'il en soit, les deux visions, qui ne s'excluent pas, font intervenir la phosphatase alcaline, une enzyme retrouvée dans les ostéoblastes et les chondrocytes, sous forme membranaire et excrétée (Anh et al., 1998), ainsi qu'à l'intérieur des vésicules matricielles où peuvent se former les cristaux (Thouverey et al., 2009). Cette hydrolase identifiée en 1923 (Robison, 1923), est capable de rompre les liaisons organophosphates et ainsi de relarguer des

sels de calcium (Bellows et al., 1991), capables de s'agréger au niveau de sites de nucléation. Comme la minéralisation de la matrice osseuse est centripète, on peut supposer que les phosphatases alcalines peuvent diffuser à travers les fibres de collagène ou qu'elles sont enfouies au cours de la phase de synthèse de l'ostéoïde.

La minéralisation primaire décrite ci-dessus permet le dépôt de 75% de la charge minérale tissulaire maximale (Meunier and Boivin, 1997). Une longue minéralisation secondaire permettra ensuite la maturation des cristaux d'HAP (Bala et al., 2009) ainsi que l'augmentation de leur nombre et de leur taille (Glimcher, 1987).

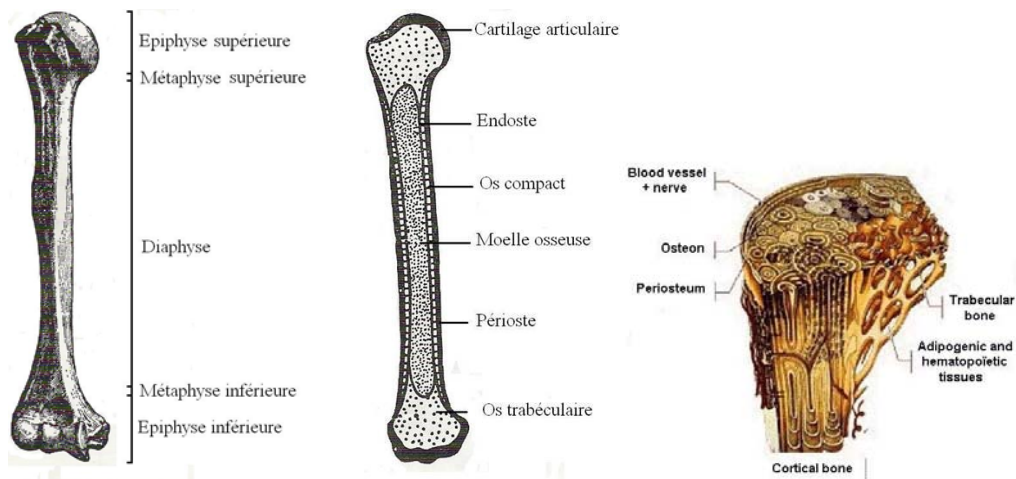
La minéralisation de la MEC confère ainsi à l'os sa résistance à la rupture, de part la dureté qu'elle lui procure (Buckwalter and Cooper, 1987). La phase minérale a de plus un grand rôle dans l'homéostasie phosphocalcique car les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{PO}_4^{3-}$  sont situés en surface des cristaux d'HAP et participent à de rapides échanges avec le liquide interstitiel et le sang, sous l'influence de facteurs exogènes et endogènes.

### *1.1.1.3. Différents types d'os - le cortical et le trabéculaire*

Comme évoqué précédemment, le tissu osseux lamellaire se divise en deux catégories (Figure 1). L'os cortical représente 80% de la masse totale osseuse. Il constitue l'enveloppe des os plats et courts et la périphérie de la diaphyse des os longs, où il délimite un canal central occupé par la moelle osseuse ("moelle rouge", occupé par des progéniteurs hématopoïétiques chez l'enfant et "moelle jaune", occupée principalement par du tissu adipeux, chez l'adulte). C'est un os dense, organisé en structures cylindriques orientées le long de l'axe principal de l'os et construites autour des vaisseaux sanguins. Ces structures, appelés ostéons, ou systèmes de Havers, résultent de l'activité de modelage au cours de la croissance et de l'activité de remodelage chez l'adulte. Chaque ostéon, dont le diamètre varie entre 200 et 300 $\mu\text{m}$ , est composé de lamelles concentriques de collagène de type I minéralisées (de 5 à 20) qui délimitent un canal central nommé canal de Havers, de 50 $\mu\text{m}$  de diamètre. Ils sont orientés, dans les os longs, parallèlement à la diaphyse, conférant ainsi à l'os cortical une résistance optimale aux contraintes mécaniques, du fait que les ostéons suivent les lignes de forces exercées sur l'os. Les ostéons servent aussi de passage à des capillaires, artérioles, nerfs amyéliniques et canaux lymphatiques. Chaque paquet neuro-lympho-vasculaires s'anastomose alors avec l'endoste et le périoste par les canaux de Volkmann, orientés perpendiculairement ou obliquement par rapport aux canaux de Havers.

La densité de l'os cortical en fait un réservoir important de calcium mais il représente seulement 20% des surfaces accessibles aux échanges, ce qui explique qu'il soit métaboliquement peu actif.

L'os trabéculaire, représentant 20% de la masse totale osseuse, est formé d'un réseau en trois dimensions de plaques osseuses reliées entre elles ("paquets osseux") et dont l'orientation est générée par les forces mécaniques qui s'exercent sur l'os, phénomène connu depuis plus de 100 ans (Wolff, 1892). Ces travées osseuses sont entourées de tissu adipeux et du tissu hématopoïétique richement vascularisé constituant la moelle osseuse. La géométrie et la distribution des plaques confèrent à l'os trabéculaire résistance et flexibilité. Sa localisation au sein des pièces osseuses souligne ce rôle mécanique; on le retrouve en effet principalement au niveau des métaphyses et des épiphyses des os longs, où les charges mécaniques sont les plus importantes, et dans les parties centrales des os courts et des vertèbres. Le maillage de l'os trabéculaire permet à une large surface osseuse d'être en contact avec le micro-environnement osseux, autorisant de nombreux échanges avec le liquide interstitiel et le sang. Ce type osseux représente en effet 80% de la surface osseuse totale. Cette zone de haute activité métabolique est la principale cible des hormones.



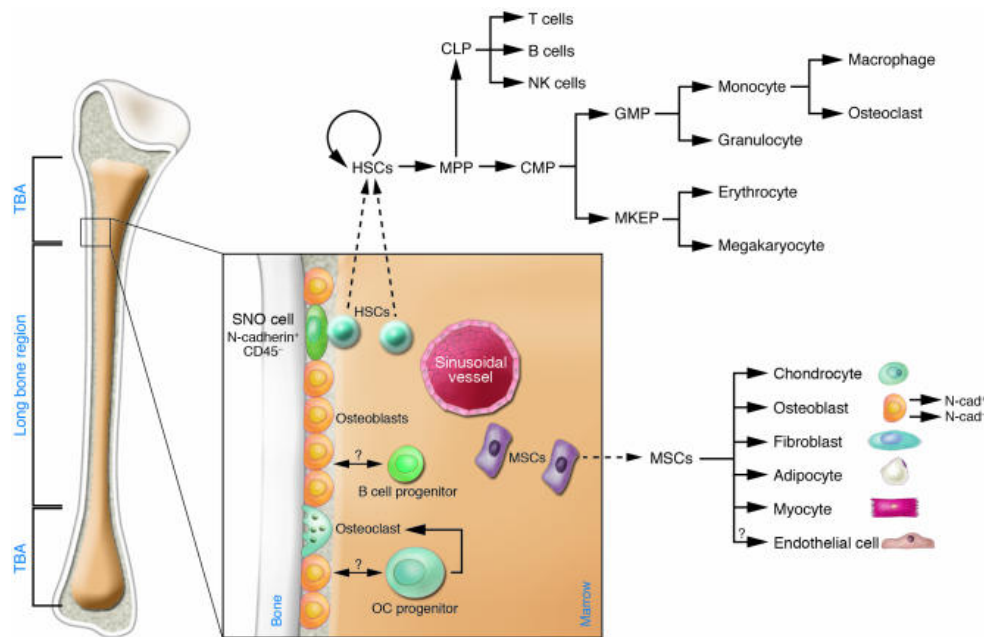
**Figure 1: Localisation et structure des différents types osseux: le cortical et le trabéculaire.**

A gauche: subdivisions d'un os long. Au centre: répartition de l'os cortical et de l'os trabéculaire dans un os long. A droite: grossissement de la zone métaphysaire d'un os long, montrant les ostéons de l'os cortical desquels émanent les paquets neuro-lympho-vasculaires, et les paquets osseux de l'os trabéculaire, entourés de moelle osseuse et adipeuse.

Source: A gauche et au centre: adapté de Atlas d'anatomie et de physiologie, fascicule 1, deuxième édition, Seguy B., à droite: adapté de Gray's anatomy, 35th edit Longman Edinburgh, 1973.

### 1.1.2. Les cellules osseuses

Il est aujourd'hui bien établi que la moelle osseuse est la principale source de cellules ostéoprogénitrices. Deux grands groupes de cellules ostéoprogénitrices apparaissent. D'une part les progéniteurs de la lignée mésenchymateuse (MSC, Mesenchymal Stem Cells), donnant naissance aux ostéoblastes, chondroblastes, adipocytes ou myocytes selon l'expression de certains facteurs de transcription, et d'autre part les progéniteurs de la lignée hématopoïétique (HSC, Hematopoietic Stem Cells), donnant naissance aux différentes cellules du sang et du système immunitaire, notamment aux cellules myéloïdes (cellules dendritiques, macrophages) desquelles dérivent les ostéoclastes (Figure 2).



**Figure 2: La moelle osseuse renferme les progéniteurs des cellules osseuses.**

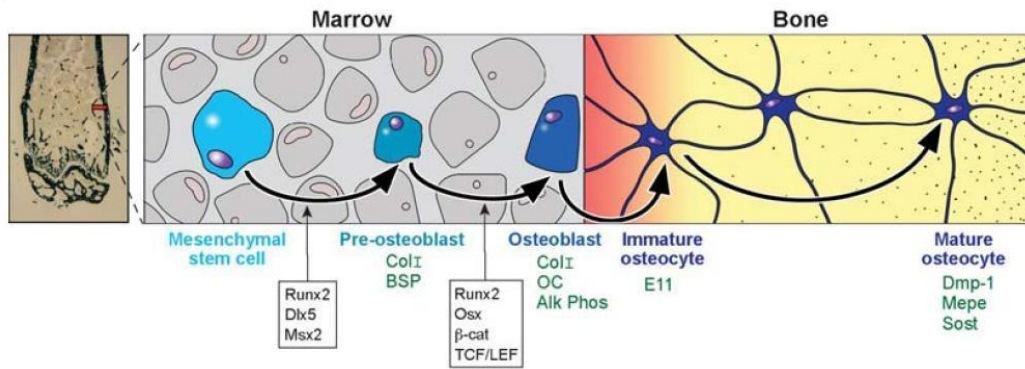
Sous le contrôle de différents facteurs de transcription, les progéniteurs mésenchymateux (MSC) vont pouvoir engager la différenciation de cellules vers la voie ostéoblastique, chondroblastique, fibroblastique, adipocytaire ou musculaire. De même, les progéniteurs hématopoïétiques pourront engager la différenciation des cellules vers la voie lymphoïde (CLP), ou myéloïde (CMP), débouchant sur l'ostéoclaste, selon les signaux du micro-environnement.

Abréviations: MSC: Mesenchymal Stem Cells, HSC: Hematopoïetic Stem Cells, MPP: MultiPotent Progenitor stem cells, CLP: Common Lymphoid Progenitor, CMP: Common Myeloid Progenitor, MKEP: Megakaryocyte Erythroid Progenitor, GMP: Granulocyte/Macrophage Progenitor, OC: Osteoclast, SNO cells: Spindle Shaped N-cadherin<sup>+</sup> nCD45<sup>-</sup> osteoblastic cells, TBA: Trabecular Bone Area.

Source: [http://www.biology-online.org/js/tiny\\_mce/plugins/imagemanager/files/boa002/JCI0628568-f1.jpg](http://www.biology-online.org/js/tiny_mce/plugins/imagemanager/files/boa002/JCI0628568-f1.jpg)

### 1.1.2.1. Les cellules ostéoblastiques

Elles prennent naissance à partir des cellules souches mésenchymateuses de la moelle mais aussi à partir de cellules souches du périoste (Owen and Friedenstein, 1988). L'expression des facteurs de transcription Runx2 (Runt-related transcription factor-2) connus aussi sous le nom de cbfa1 (core binding factor  $\alpha$ 1) ou encore osf2 (osteoblast specific factor-2) (Ducy et al., 1997; Komori, 2008; Otto et al., 1997), Dlx5 (Distal-less homeobox-5) (Robledo et al., 2002) et Msx2 (msh homeobox homolog-2) (Bendall and Abate-Shen, 2000) est nécessaire pour l'engagement des précurseurs vers la voie ostéoblastique, aux dépens des voies adipocytaires (nécessitant les facteurs de transcriptions PPAR $\gamma$ , Peroxysome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$ , cEBP $\alpha$ , ccaat/Enhancer Binding Protein  $\alpha$ ) ou chondrocytaires (nécessitant le facteur de transcription Sox9). Le pré-ostéoblaste est une cellule de petite taille (10 à 20 $\mu$ m) synthétisant alors du collagène de type I et de la BSP. Un engagement plus poussé dans la voie ostéoblastique nécessite alors le maintien de l'expression de Runx2 (Ducy et al., 1997), l'expression d'ostérix (osx) (Nakashima et al., 2002) et divers composants de la voie de signalisation wnt (Wnt) (Hu et al., 2005). L'ostéoblaste mature synthétise alors du collagène de type I, de l'ostéocalcine et de la phosphatase alcaline, permettant la minéralisation de la MEC (cf. B. Chapitre I-1.1.1.2. La phase minérale). A la fin de la phase active de synthèse de l'ostéoïde, les ostéoblastes peuvent suivre quatre chemins différents. i) Soit ils se font emmurer dans la matrice osseuse et deviennent des ostéocytes, ii) soit deviennent inactifs et se transdifférencient en cellules bordantes, iii) soit meurent par apoptose ou encore iv) se transdifférencient en cellules déposant du cartilage (Li et al., 2004). Il est ainsi communément admis qu'entre 10 et 30% des ostéoblastes matures se font emmurer dans l'ostéoïde qu'ils synthétisent (Franz-Odenaal et al., 2006), et émettent alors de longs prolongements cytoplasmiques qui leur permettent de rester en communication avec les cellules de surface. Ils expriment alors E11, un marqueur précoce de l'ostéocyte (Wetterwald et al., 1996). Les cellules à ce niveau sont considérées comme des ostéocytes immatures. Lorsque la MEC est minéralisée, l'ostéocyte prisonnier exprime alors de nouveaux marqueurs comme DMP-1 (Dentin Matrix Protein-1) (Feng et al., 2003), MEPE (Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein) (Nampei et al., 2004) et SOST (sclérostine) (van Bezooijen et al., 2004), ce dernier étant reconnu comme un modulateur important de la formation osseuse (Poole et al., 2005) ([Figure 3](#)).



**Figure 3: Différenciation ostéoblastique.**

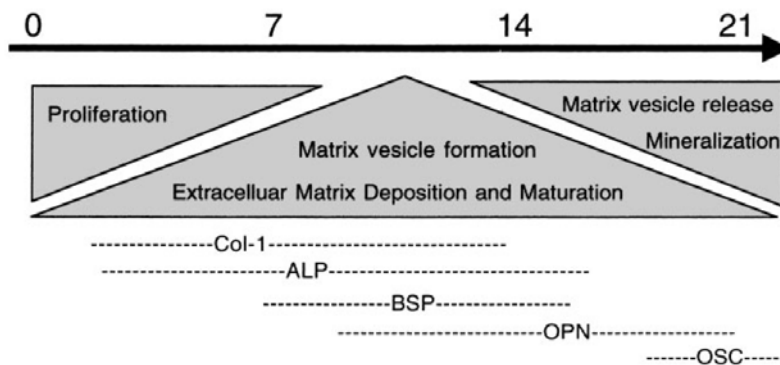
La voie communément admise de différenciation ostéoblastique débute par l'engagement de précurseurs mésenchymateux et finit par l'emmurement des ostéocytes, état de différenciation terminal des ostéoblastes.

Abréviations: Col I: collagène de type I, BSP: Bone SialoProtein, OC: OsteoCalcin, Alk Phos: Alkaline Phosphatase, Dmp-1: Dentin matrix protein-1, Mepe: Matrix extracellular phosphoglycoprotein, Sost: sclerostin.

Source: (Robling et al., 2006)

### 1.1.2.1.1. Les ostéoblastes

Les ostéoblastes matures sont des cellules mononuclées de 20 à 50µm de diamètre, alignées et attachées sur la matrice osseuse qu'elles synthétisent (cf. B. Chapitre I-1.1.1.1. La phase organique) et minéralisent (cf. B. Chapitre I-1.1.1.2. La phase minérale). Le cytoplasme de ces cellules est fortement basique et très riche en organites spécialisés dans les synthèses protéiques (réticulum endoplasmique très important), ce qui témoigne d'une intense activité de synthèse protéique. Trois étapes rythment la vie d'un ostéoblaste. En début de vie, les pré-ostéoblastes vont proliférer (ce sont les seuls membres de la lignée ostéoblastique à pouvoir le faire). Suivra une phase de synthèse active de MEC organique par les ostéoblastes matures et une phase de minéralisation de cette MEC (Beck, 2003) (Figure 4). Cette séquence est contrôlée par les facteurs de transcription précédemment cités (cf. B. Chapitre I-1.1.2.1. Les cellules ostéoblastiques), mais aussi par le micro-environnement osseux, faisant intervenir les relations intercellulaires, comme les cadhérines (Mbalaviele et al., 2006) et les relations cellule-matrice, comme les intégrines (Xiao et al., 2000) (cf. B. Chapitre II-1.1.3.1. Les intégrines). La séquence de différenciation est aussi régulée par de multiples facteurs locaux et hormonaux comme l'hormone parathyroïdienne (PTH) (Krishnan et al., 2003), les hormones sexuelles (Kousteni et al., 2007), les glucocorticoïdes (Canalis, 2005) ou la vitamine D (van Driel et al., 2004). Le contrôle de la séquence à différents niveaux permet une régulation dans l'espace et dans le temps de l'expression et de la synthèse des protéines de la MEC.



**Figure 4: Diagramme représentant les trois grandes étapes de la vie de l'ostéoblaste (exemple des MC3T3-E1, lignée pré-ostéoblastique murine immortalisée capable de se différencier en ostéoblaste minéralisant).** En début de vie (0 jour), les pré-ostéoblastes prolifèrent jusqu'à devenir confluents et sortir du cycle cellulaire. A ce moment, les ostéoblastes entre dans une phase active de synthèse de la matrice organique (7 jours), avec la synthèse de protéines comme le collagène de type I (Col-I), la phosphatase alcaline (ALP), la sialoprotéine osseuse (BSO), l'ostéopontine (OPN) et l'ostéocalcine (OSC). La chronologie de synthèse de ces molécules de la MEC est indiquée. Suit alors une phase de minéralisation (14 jours).  
Source: (Beck, 2003).

#### 1.1.2.1.2. Les cellules bordantes

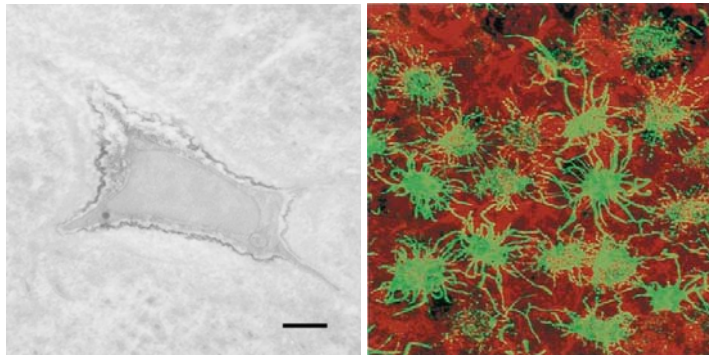
Appelées aussi ostéocytes de surface, ostéoblastes inactifs, cellules bordantes de l'endoste, ou cellules mésenchymateuses aplaties (Miller and Jee, 1987), ce sont des ostéoblastes qui deviennent progressivement aplaties et forment une couche cellulaire attachée et alignée le long des surfaces osseuses inactives (sans ostéogénèse ni ostéoclasie). Leur noyau est ovoïde et aplati, et leur cytoplasme pauvre en organites. Elles sont unies entre elles et aux ostéocytes par des systèmes jonctionnels de "gap junctions" (Miller et al., 1989) et se comportent comme une barrière fonctionnelle entre la moelle osseuse et l'os calcifié. Un rôle important dans le remodelage osseux leur est attribué, comme nous allons le voir par la suite (cf. B. Chapitre I-1.2. Le remodelage osseux). En bref, elles jouent un rôle déterminant dans la préparation de l'activité de résorption ostéoclastique (Chambers et al., 1985; Chambers and Fuller, 1985), mais aussi ostéoblastique (Everts et al., 2002), tout en délimitant une zone dans laquelle a lieu le remodelage, le BRC (Bone Remodeling Compartment) (Hauge et al., 2001). Les cellules bordantes seraient également une source de cellules ostéoblastiques de réserve car seraient capables de se différencier en cellules ostéogéniques (Dobnig and Turner, 1995).



### 1.1.2.1.3. Les ostéocytes

Ce stade de différenciation terminal de l'ostéoblaste représente plus de 90% des cellules du tissu osseux, mais seulement un ostéoblaste sur 10 deviendra un ostéocyte, ce qui implique que les ostéocytes aient une durée de vie bien plus importante que les ostéoblastes (qui ne vivent que trois mois chez l'homme) (Manolagas, 2000). La décision de l'engagement vers l'ostéocyte peut être faite par un profil d'expression génique spécifique de certains ostéoblastes ou par des contacts privilégiés de l'ostéoblaste avec les autres cellules osseuses (Candelieri et al., 2001). La présence du minéral environnant en lui-même (Irie et al., 2008) ou la diminution de la pression partielle en oxygène (l'emprisonnement dans la MEC minéralisée génère des conditions hypoxiques) (Hirao et al., 2007) ont aussi été suggérées comme des facteurs pouvant engager l'ostéoblaste dans sa maturation finale. Cette transition d'un ostéoblaste mature à un ostéocyte se fait par "enterrement" progressif dans la MEC, minéralisée par la suite. En effet, au début de sa transition, l'ostéoblaste se fait emmurer dans la MEC organique. On le nomme alors ostéocyte ostéoblastique ou pré-ostéocyte de type I. Ce type de cellule a les mêmes caractéristiques morphologiques que l'ostéoblaste. Puis la MEC organique va l'entourer de plus en plus, ce qui en fera un ostéocyte de l'ostéoïde ou pré-ostéocyte de type II. Lorsque la cellule sera totalement emmurée dans le MEC organique, elle deviendra un préostéocyte de type III. La minéralisation de la MEC verra la différenciation de l'ostéocyte jeune en ostéocyte mature, type le plus représenté (Franz-Odenaal et al., 2006).

Au sein de la MEC, l'ostéocyte se trouve alors dans une logette appelée ostéoplaste, à partir de laquelle il émettra de longs prolongements cytoplasmiques à travers un réseau de canalicules (Figure 5), lui permettant de rester en contact avec les autres ostéocytes et avec les cellules de surface (Palumbo et al., 1990) par des systèmes de "gap junctions" (Civitelli, 2008). Ces longs prolongements, atteignant une longueur totale de 1mm/cellule, permettent par ailleurs à l'ostéocyte d'augmenter sa surface de contact avec son micro-environnement, possible moyen employé pour mieux pouvoir appréhender les stimuli pouvant en émaner (Sugawara et al., 2005). La transformation de l'ostéoblaste en ostéocyte aboutie alors à une diminution finale de 70 % de la taille du corps cellulaire (Palumbo, 1986), mais à une augmentation du rapport nucléo-cytoplasmique (Aarden et al., 1994) ainsi qu'à une diminution de la constante d'élasticité de la cellule (Sugawara et al., 2008), faisant de l'ostéocyte une cellule "plus molle" que l'ostéoblaste.



**Figure 5: Morphologie de l'ostéocyte.**

A gauche: image de microscopie électronique montrant un ostéocyte dans son ostéoplaste. Le marquage tout le long de la logette ostéocytaire et entre la logette et la membrane plasmique de l'ostéocyte signale la présence de sclérostine (barre=1 $\mu$ m). A droite: marquage fluorescent (anticorps OB7.3, en vert) d'un réseau d'ostéocytes, permettant de voir les longs prolongements cytoplasmiques (1mm au total/cellule).

Source: A gauche: (Irie et al., 2008), à droite: (Kamioka et al., 2001).

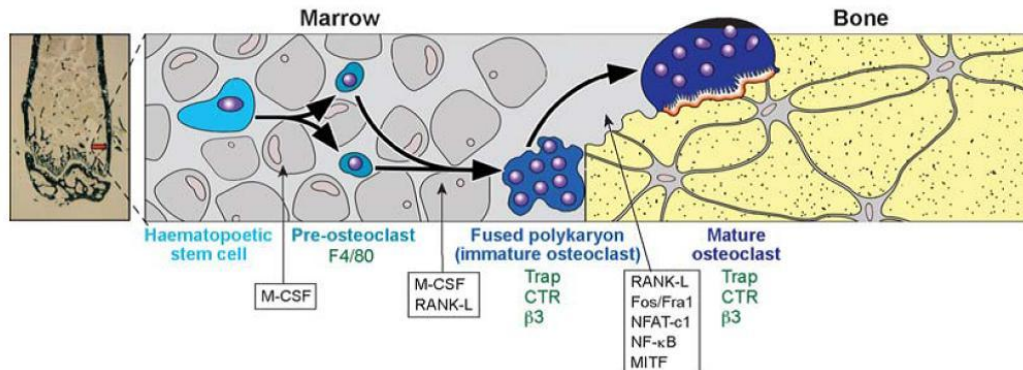
Outre ces modifications morphologiques importantes, l'ostéocyte a un profil d'expression génique (Paic et al., 2009) et protéique (Aarden et al., 1996; Franz-Odenaal et al., 2006) différent de celui de l'ostéoblaste. Notamment, une chute dans la production de collagène de type I et de phosphatase alcaline, ainsi qu'une production augmentée d'ostéopontine se produit. Il est intéressant de noter que l'ostéocyte est aussi capable d'ostéolyse, et ainsi de participer au maintien de l'homéostasie phospho-calcique (Teti and Zallone, 2009). Malgré son emprisonnement, l'ostéocyte serait de plus une cellule dotée d'une grande mobilité (Dallas et al., 2009).

Un rôle de "chef d'orchestre" des ostéocytes a pu être rendu évident dans une étude visant à supprimer la majorité des ostéocytes *in vivo* (Tatsumi et al., 2007). Dans ces conditions, la vitesse de minéralisation de l'ostéoïde est diminuée et la résorption ostéoclastique augmentée que ce soit dans le compartiment cortical ou trabéculaire. Il en résulte d'importantes modifications de l'architecture osseuse. De plus, ces expériences montrent le rôle primordial des ostéocytes dans la réponse osseuse face aux contraintes mécaniques, l'ablation ostéocytaire abolissant les modifications osseuses liées à un modèle de décharge (cf. B. Chapitre II-2.2.2.1. Cellules ostéoblastiques). De part ce rôle de chef d'orchestre, un rôle important lui est attribué dans le remodelage osseux (Heino et al., 2009).

### 1.1.2.2. Les cellules ostéoclastiques

Elles prennent naissance à partir des cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse, mais aussi de la rate (Fuller and Chambers, 1987). L'ostéoclastogénèse débute lorsqu'une cellule

souche hématopoïétique est stimulée par le M-CSF (Macrophage Stimulating Growth Factor), pour générer une cellule mononuclée qui deviendra un pré-ostéoclaste dans la moelle osseuse, puis sera introduit dans la circulation sanguine et exprimera l'antigène de surface macrophagique F4/80 (Lean et al., 2000). Les précurseurs circulants sortiront alors de la circulation périphérique au niveau du site, ou proche du site devant être résorbé, et fusionneront les uns avec les autres afin de former un ostéoclaste immature multinucléé, sous l'influence du M-CSF et de RANK-L (Receptor Activator of Nuclear factor  $\kappa$ B Ligand) encore appelé TRANCE (Tumor necrosis factor-Related Activation-iNduced Cytokine), ODF (Osteoclast Differentiation Factor) ou OPG-L (OsteoProteGerin Ligand) (Arai et al., 1999), molécule se liant aux récepteurs RANK (Receptor Activator of Nuclear factor  $\kappa$ B) de la surface ostéoclastique (Hsu et al., 1999) (nous verrons plus en détail le système RANK/RANK-L/OPG dans B. Chapitre I-1.2. Le remodelage osseux). Ces ostéoclastes immatures expriment alors la TRAcP (Tartrate Resistant ACide Phosphatase), une enzyme nécessaire à l'activité de résorption des ostéoclastes matures. Cette enzyme permet par ailleurs de caractériser les ostéoclastes (Ballanti et al., 1997). Le récepteur à la calcitonine (CTR) permet aussi de différencier les ostéoclastes (dès le stade immature), des macrophages (Quinn et al., 1999). Sous l'influence continue de RANK-L et l'expression de certains gènes comme NFAT-c1 (Nuclear Factor of Activated T-cells calcineurin dependent-1) (Takayanagi et al., 2002) ou encore c-fos (Grigoriadis et al., 1994), l'ostéoclaste mature pourra prendre place, maintenant l'expression de nombreux marqueurs de l'ostéoclaste immature (Figure 6).



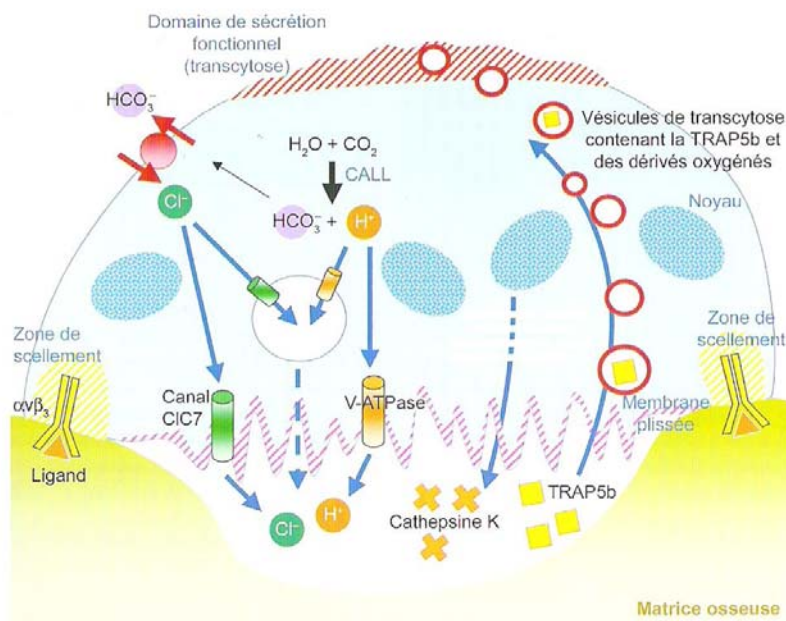
**Figure 6: Différenciation ostéoclastique.**

La différenciation ostéoclastique débute par l'engagement de précurseurs hématopoïétiques, qui par l'intervention de nombreux acteurs, va pouvoir se différencier en 'un ostéoclaste capable de résorber les surfaces osseuses.

Abréviations: M-CSF: Macrophage Colony Stimulating Factor, RANK-L: Receptor Activator of Nuclear factor  $\kappa$ B Ligand, Trap: Tartrate acid resistant phosphatase, CTR: CalciTonin receptor,  $\beta$ 3: intégrine  $\beta$ 3, NFAT-c1: Nuclear Factor of Activated T-cells calcineurin dependent-1, MITF: Microphthalmia-associated Transcription Factor.

Source: (Robling et al., 2006).

L'ostéoclaste mature est une cellule géante (environ 100µm de diamètre) dont l'activité de résorption et la survie sont dépendantes de la présence de RANK-L (Jimi et al., 1999). C'est une cellule polarisée, avec un pôle apical faisant face à la moelle osseuse et un pôle basal en contact avec l'os. L'ostéoclaste mature adhère à la surface osseuse, notamment grâce à ses intégrines  $\beta 3$  (McHugh et al., 2000), qui délimitent un compartiment spécialisé entre la membrane de l'ostéoclaste et l'os, la zone de scellement ("sealing zone") (Saltel et al., 2004; Vaananen and Horton, 1995). Cette dernière délimite une membrane spécialisée dans l'activité de résorption, la membrane plissée ou bordure en brosse ("ruffled border"). Dans ce compartiment seront déversés des ions  $H^+$ , résultant de l'activité d'une anhydrase carbonique (Lehenkari et al., 1998), permettant de dissoudre le minéral par l'acidité engendrée. S'ensuivra une dégradation protéique de la MEC déminéralisée, grâce à différentes protéases comme les MMP 9 (Matrix MetalloProteinase 9 ou gélatinase B) (Tezuka et al., 1994) ou la cathépsine K (Drake et al., 1996), déversées sous la membrane plissée. Les produits de dégradation sont évacués par transcytose, vers le pôle apical de la cellule et son domaine de sécrétion (Figure 7). L'activité de résorption laissera alors une lacune de Howship, zone localisée érodée du tissu osseux, et libérera dans le milieu extracellulaire plusieurs facteurs circulants, qui peuvent avoir un rôle dans le remodelage osseux (cf. B. Chapitre I-1.2. Le remodelage osseux).



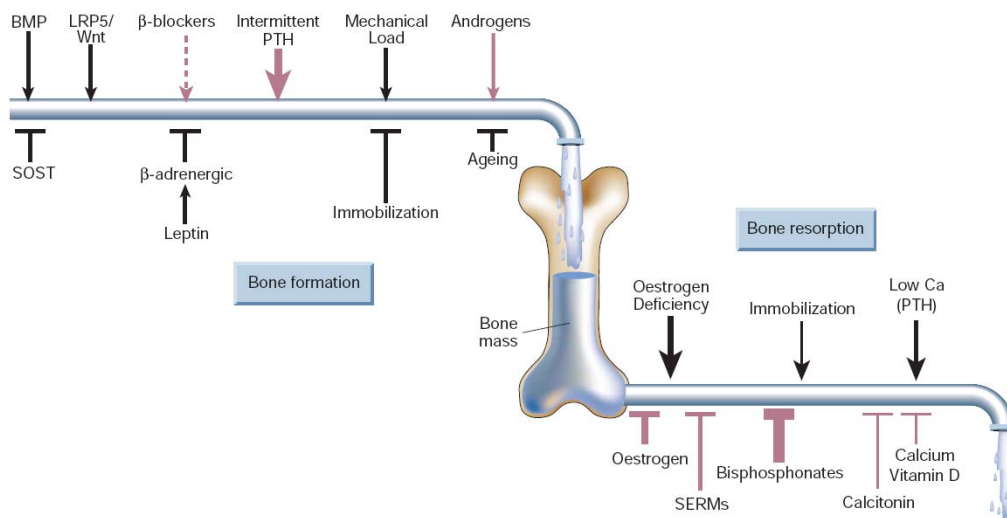
**Figure 7: Schéma d'un ostéoclaste mature.**

Des zones membranaires spécifiques et des trafics vésiculaires très présents sont caractéristiques d'un ostéoclaste actif. Les trafics vésiculaires permettent l'exocytose sous la membrane plissée de protéases telles la cathépsine K.

L'anhydrase carbonique de l'ostéoclaste permet aussi le relargage d'ion  $H^+$  vers le pôle basal, permettant, avec le relargage d'ions chlore, la dissolution du minéral. Les lyses protéiques occasionnées par la TRAcP (TRAP5b) vont permettre la transcytose des produits de dégradation de la MEC vers le pôle apical de la cellule et son domaine sécréteur. La zone de scellement de l'ostéoclaste adhère à la MEC via des intégrines  $\alpha V\beta 3$ .  
Source: (Anginot et al., 2008).

## 1.2. Le remodelage osseux

Afin de faire face aux exigences environnementales de résistance aux contraintes mécaniques et de besoins métaboliques systémiques du maintien de l'équilibre phospho-calcique, le tissu osseux, et plus exactement les cellules le composant, sont capables de répondre à différents stimuli (Figure 8), permettant de maintenir constante la masse osseuse adulte. Pour répondre de manière appropriée à ces stimulations ou besoins (Figure 8), une fine régulation de l'activité des cellules osseuses, dans l'espace et dans le temps, à due se mettre en place au cours de l'évolution.



**Figure 8: Facteurs influant sur l'homéostasie osseuse.**

La masse osseuse est maintenue constante à l'âge adulte malgré un renouvellement permanent de fractions d'os, sous l'influence de plusieurs acteurs affectant l'activité des cellules osseuses. En noir sont représentés les facteurs physiologiques et en rouge les acteurs pharmacologiques influant sur les activités de formation (à gauche) ou de résorption osseuse (à droite) (l'impact de chacun des acteurs est représenté par l'épaisseur de la flèche/la flèche en pointillée indique un traitement supposée à l'époque mais de plus en plus confirmé de nos jours (Graham et al., 2008)).

Abréviations: BMP: Bone Morphogenic Proteins, SOST: Sclerostin, LRP5: Low-density lipoprotein-Receptor-related Protein 5, Wnt: Wint, PTH: ParaThyroid Hormon, SERMs: Selective Estrogen Receptor Modulators.

Source: (Harada et al., 1995).

### 1.2.1. Les différentes phases

Les différents acteurs cellulaires décrits précédemment prennent tous une place dans le phénomène de remodelage osseux (Sims and Gooi, 2008), faisant du squelette un tissu dynamique. En fait, une coopération cellulaire va prendre place au sein d'une unité multicellulaire de remodelage: la BMU (Bone Multicellular Unit). De plus, dans cette BMU, la fraction osseuse enlevée par les ostéoclastes, pour raison de mauvais rendement mécanique ou besoin métabolique, sera égale à celle déposée par les ostéoblastes, montrant la coordination des activités cellulaires. Quatre grandes phases peuvent être décrites dans le remodelage osseux: la phase de résorption, la phase d'inversion, la phase de formation et la phase de quiescence (Figure 9).

Un cycle de remodelage osseux débute, à l'état physiologique, par une étape de résorption de la MEC minéralisée. La localisation du site à remodeler par les ostéoclastes ainsi que leur activation s'effectue probablement par l'intervention des ostéocytes, dont l'apoptose liée à des sites osseux micro-fracturés (Cardoso et al., 2008; Verborgt et al., 2002), génère des corps apoptotiques capables d'activer la résorption ostéoclastique (Kogianni et al., 2008), et ainsi d'activer le remodelage osseux (Noble et al., 2003). Le ciblage direct des précurseurs ostéoclastiques de la moelle osseuse par les ostéocytes est possible car il a été montré que certaines extensions cytoplasmiques de l'ostéocyte arrivaient jusque dans la moelle osseuse (Kamioka et al., 2001). De plus, ce ciblage des ostéoclastes au site nécessitant un remodelage osseux peut dépendre de facteurs déposés dans la MEC au cycle de formation précédent, et relargués par l'apoptose ostéocytaire et/ou les ostéoblastes. En effet, le collagène de type I, l' $\alpha$ 2-HS glycoprotéine ou encore l'ostéocalcine (cf. B. Chapitre I-1.1.1.1. La phase organique) sont des chémo-attractants pour les ostéoclastes (Malone et al., 1982). La préparation de la surface osseuse à résorber par les cellules bordantes, grâce au relargage de collagénase, permettant de dissoudre la fine couche d'ostéoïde non minéralisée (*lamina limitans*) et d'exposer le minéral sous jacent (Chambers et al., 1985; Chambers and Fuller, 1985), pourrait aussi permettre le recrutement de précurseurs par ce moyen. Ces facteurs pourraient également permettre, par résorption de la matrice, le recrutement de plus de précurseurs ostéoclastiques au site considéré. En effet, un recrutement permanent de précurseurs ostéoclastiques est nécessaire durant la phase de résorption car la durée de vie moyenne d'un ostéoclaste est de 12,5 jours (Hill, 1998).

Comme nous l'avons vu précédemment, les précurseurs ostéoclastiques, qui prennent naissance notamment dans la moelle osseuse, forment des ostéoclastes multinucléés par l'interaction de leur récepteur de surface RANK avec le RANKL (cf. B. Chapitre I-1.1.2.2. Les cellules ostéoclastiques). Les cellules de la lignée ostéoblastique jouent un rôle critique dans ce phénomène, puisqu'elles expriment RANKL (Suda et al., 1999). Le contrôle de l'ostéoclastogénèse par les cellules ostéoblastiques ne s'arrête pas là étant donné que ces cellules peuvent aussi produire OPG (ostéoprotégérine), un récepteur leurre de RANKL, qui empêche son interaction avec le récepteur RANK de la surface ostéoclastique, et altère ainsi l'ostéoclastogénèse qui s'ensuit (Bucay et al., 1998; Vidal et al., 1998). De plus, le M-CSF, permettant l'engagement des préostéoclastes, est lui aussi exprimé par les cellules ostéoblastiques (Yao et al., 2002), faisant en sorte que cette communication ostéoblaste-ostéoclaste puisse pleinement assurer l'ostéoclastogénèse.

Les ostéoclastes matures adhèrent alors au site osseux cible par leurs intégrines  $\beta 3$  (cf. B. Chapitre I-1.1.2.2. Les cellules ostéoclastiques), interagissant avec des protéines de la MEC comme l'ostéopontine ou la BSP (cf. B. Chapitre II-1.1.3.1. Les intégrines), déposées lors du cycle de formation précédent. Le site osseux considéré est alors résorbé, par l'action des ostéoclastes matures, alternant entre des phases de migration durant lesquelles il n'y a pas d'activité de résorption et des phases statiques de résorption (Saltel et al., 2004). Nous pouvons penser qu'à ce niveau, la longueur de l'activité statique de résorption sera dictée par la quantité de minéral mis en solution. En effet, des quantités trop importantes de calcium entraînent la rétraction des ostéoclastes de la surface osseuse (Zaidi et al., 2004), pouvant permettre leur migration (Boudot et al., 2010) vers un site proche dans la BMU (Libouban, 2008). A la fin de leur activité de résorption, les ostéoclastes mourront par apoptose (Hill, 1998).

Dans la zone où les fractions d'os sont résorbées, les cellules bordantes, présentes en permanence, vont former une barrière isolant la BMU du reste de l'os, en formant un toit au niveau de la moelle osseuse, en coupant les liens qu'elles avaient ("gap junctions") avec les ostéocytes, créant ainsi un BRC (Bone Remodeling Compartment) (Hauge et al., 2001). Ce compartiment procure un micro-environnement propice aux couplages entre les cellules osseuses. De plus, ce compartiment est décrit dans l'étude de Hauge et al. comme étant vascularisé, permettant l'arrivée permanente de progéniteurs ostéoclastiques durant la phase de résorption. L'arrivée de cellules mésenchymateuses dans ce compartiment est plus difficile à expliquer. Cependant, il a été montré que les péricytes de la micro-circulation de la moelle

pouvaient être une source de précurseurs ostéoblastiques (Diaz-Flores et al., 2009). D'autres pensent que les cellules de la canopée elle-mêmes sont capables de se différencier en ostéoblastes (Parfitt, 2001).

Après le départ des ostéoclastes, des cellules mononucléées d'origine inconnue (Domon et al., 2001) arrivent sur la surface osseuse durant la phase d'inversion. Ces cellules ont été suggérées être des phagocytes mononucléés (Tran Van et al., 1982) ou des cellules de la lignée ostéoblastique (Everts et al., 2002; Mulari et al., 2004). Elles permettent de compléter la résorption osseuse et d'apposer une matrice riche en ostéopontine (McKee and Nanci, 1996) et pauvre en collagène de type I (Skedros et al., 2005) à l'interface osseuse. Cette matrice est connue sous le nom de ligne cimentante ("cement line") ou ligne de reversion ("reversal line").

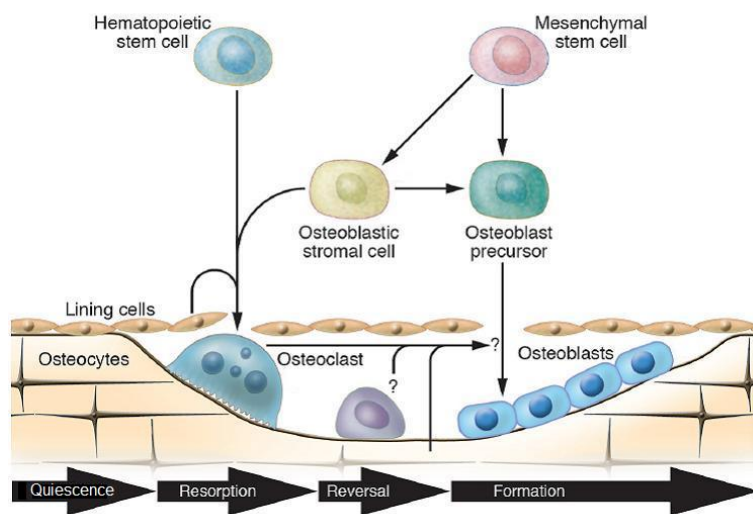
Cette interface, faite de molécules contenant des motifs RGD (Arg-Gly-Asp), propices à l'adhésion cellulaire (Bernards et al., 2008; Durrieu et al., 2004; Le Guillou-Buffello et al., 2008), pourra favoriser l'attachement des ostéoblastes. Il a de plus été montré que le dépôt de cette matrice était critique pour la formation d'os lamellaire organisé (Everts et al., 2002; Romano et al., 1997). Durant cette phase, le BRC se retire partiellement (les deux-tiers recouvrent l'ostéoïde déminéralisé (Hauge et al., 2001)). Les cellules ostéoformatrices vont alors pouvoir synthétiser des fractions d'os à nouveau mécaniquement compétentes aux zones érodées, en formant une unité structurale osseuse (BSU: Bone Structural Unit). En effet, l'ostéoblaste a la capacité de déceler la topographie des zones érodées (Boyan et al., 2003; Dalby et al., 2006; Gray et al., 1996; Mulari et al., 2004) et/ou peut être stimulé par des facteurs chimiques laissés par les ostéoclastes (Dodds et al., 1995; Karsdal et al., 2008; Martin and Sims, 2005) ou libérés lors de la résorption (Sheu et al., 2003; Sheu et al., 2002), et d'y apposer de nouvelles fractions osseuses. Ainsi, la qualité physico-chimique de la MEC laissée par les ostéoclastes et les cellules de la phase de réversion pourra contrôler la formation osseuse, de manière appropriée aux besoins. De plus, la sclérostine, molécule produite par les ostéocytes, inhibant la voie des BMP et la formation osseuse (van Bezooijen et al., 2004; Winkler et al., 2003) en altérant la signalisation de la voie Wnt (van Bezooijen et al., 2007), peut moduler, sous l'influence des contraintes mécaniques (Robling et al., 2006) ou d'hormones comme la PTH (Bellido et al., 2005), l'activité de formation des ostéoblastes.

A la suite de cette phase de formation, les ostéoblastes deviennent aplatis et cessent leur activité de synthèse lors de la phase de quiescence. Ils deviennent alors des cellules bordantes



(d'autres meurent par apoptose et d'autres suivent la voie de différenciation ostéocytaire, comme énoncé plus haut (cf. B. Chapitre I-1.1.2.1. Les cellules ostéoblastiques)). Certaines de ces cellules bordantes formeront probablement la BRC du cycle de remodelage suivant (Hauge et al., 2001). La MEC sera alors minéralisée une dizaine de jours après le dépôt de l'ostéoïde (Hill, 1998), processus pouvant également être contrôlé par la signalisation des ostéocytes (Feng et al., 2006).

Un cycle de remodelage osseux prend ainsi fin, et aura vu une coopération étroite dans l'espace et dans le temps entre les différentes cellules osseuses d'une BMU (les ostéoclastes travaillant de façon isolée et les cellules ostéoblastiques travaillant en association), afin que la zone à éroder et à remplacer soit ciblée.



**Figure 9: Le remodelage osseux.**

Le cycle de remodelage osseux est ici représenté de gauche à droite de manière temporelle. L'activation des ostéoclastes est initiée par interaction de cellules souches hématopoïétiques avec les cellules ostéoblastiques. La phase de résorption prend alors place, avec résorption de fractions d'os ayant atteint la fin de leur vie fonctionnelle. Cette étape dure chez l'homme environ deux semaines (Hadjidakis and Androulakis, 2006). Suit à cette phase une phase de réversion où des cellules mononucléées finissent le travail de résorption et préparent la surface pour la formation osseuse. Cette phase dure chez l'homme quatre à cinq semaines (Hadjidakis and Androulakis, 2006). Après cette phase vient l'étape de formation, durant chez l'homme environ quatre mois (Hadjidakis and Androulakis, 2006), au cours de laquelle une matrice organique est déposée par les ostéoblastes, sous contrôle des produits relargués par les ostéoclastes. S'ensuivra alors la minéralisation de la matrice osseuse. Durant la durée du cycle de remodelage, l'unité multicellulaire de remodelage (BMU), comprenant les différentes cellules osseuses, est recouverte par un "toit" de cellules bordantes, permettant une compartimentalisation de la zone en remodelage: c'est le compartiment de remodelage osseux (BRC).

Source: adapté de (Raisz, 2005).

Durant le cycle de remodelage, la matrice osseuse voit aussi évoluer son degré de minéralisation, entre les différents BSU et même à l'intérieur d'un BSU (Follet et al., 2004;

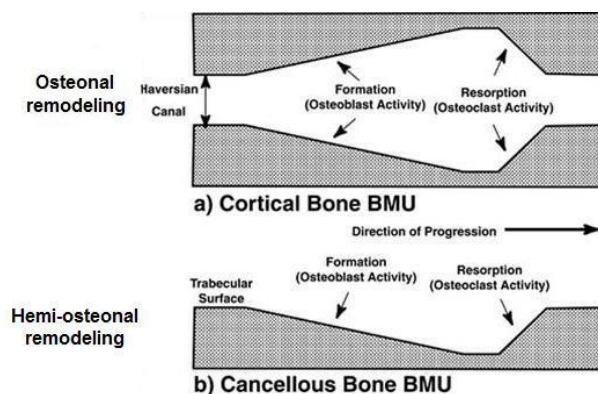
Meunier and Boivin, 1997). Ces variations du degré de minéralisation dépendent de la vitesse du remodelage (Boivin and Meunier, 2002). En effet, de part la durée des différentes phases (la phase de formation est la phase la plus longue (Figure 9), on peut facilement concevoir que si le cycle de remodelage est rapide, les fractions osseuses ne pourront se minéraliser entièrement, alors que si le cycle est lent, la minéralisation pourra se dérouler dans sa totalité. Il en découle de même que plus les BSU sont anciennes, plus elles sont minéralisées, dans un contexte physiologique.

Les cellules osseuses se trouvent ainsi dans un environnement tridimensionnel de matrice organique, principalement formée de collagène de type I, plus ou moins minéralisé, dont la structure est finement régulée au cours du remodelage osseux. On estime que 10% de la masse osseuse est renouvelée chaque année chez l'homme. Ceci provient d'un renouvellement de 2 à 5% de l'os cortical par an (Hajadikis) et de 25% de l'os trabéculaire par an (Libouban, 2008).

### 1.2.2. Différents remodelages selon le compartiment osseux

Bien que la séquence de remodelage osseux décrite se produise dans les tissus osseux corticaux et trabéculaires, quelques différences entre ces deux compartiments existent. Ces différences concernent l'organisation des BMU. Dans le tissu osseux cortical, les ostéoclastes, situés à l'avant des BMU, forment des canaux circulaires, formant ainsi des tunnels appelés "cutting cone" (Parfitt, 1994). Les ostéoblastes se situant en arrière de la BMU se disposent de façon circulaire pour fabriquer un nouvel ostéon, comblant le tunnel formé, appelé "closing cone" (Parfitt, 1994). Ce type de remodelage est appelé remodelage ostéonal (Figure 10).

Le remodelage du tissu osseux trabéculaire s'effectue en surface, les ostéoclastes creusant des tranchées dans une BMU. Les ostéoblastes remplacent alors les fractions osseuses érodées dans ces tranchées. Pour cette raison, ce type de remodelage est appelé héli-ostéonal, puisqu'un aspect surfacique seulement est présent (Figure 10). Le nombre et la fréquence d'activation des BMU dans ce compartiment est vingt fois supérieure à ceux du tissu osseux cortical (Libouban, 2008), permettant d'établir un meilleur pourcentage de renouvellement dans ce compartiment osseux, comme signalé précédemment. Il est aussi à noter qu'à n'importe quel moment, 20% de l'os trabéculaire est en cours de remodelage (Hill).



**Figure 10: Remodelage ostéonal et hémi-ostéonal des compartiments osseux corticaux et trabéculaires.**

Dans le tissu osseux cortical (a), les ostéoclastes d'une BMU creusent un tunnel, remplacé par des fractions osseuses nouvelles par l'action des ostéoblastes, à l'arrière du cône formé. Ces activités forment l'ostéon et le canal de Havers. Dans le tissu osseux trabéculaire (b), les activités cellulaires osseuses se produisent le long des travées osseuses, les ostéoclastes creusant des tranchées et les ostéoblastes les comblant avec des fractions osseuses nouvellement synthétisées. Du fait que le remodelage se fait en surface pour l'os trabéculaire, il est nommé remodelage hémi-ostéonal, pour signifier la similitude au remodelage ostéonal de l'os cortical, mais sur une moitié de la surface.

Source: adapté de (Hernandez et al., 2000).

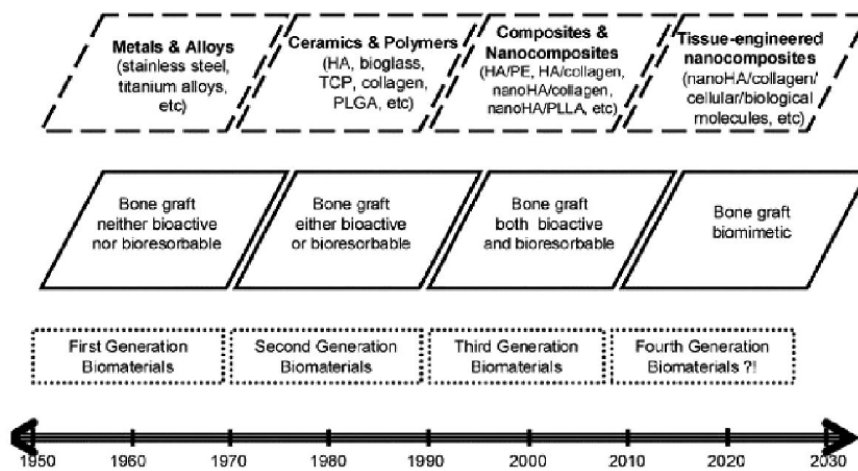
## 2. Interactions matrice-cellules osseuses

### 2.1. Les matériaux mimétiques de l'os

Le tissu osseux est capable de se régénérer seul en cas de lésions, grâce au remodelage osseux. Cependant, si les défauts occasionnés dépassent une certaine taille, une intervention clinique s'avère nécessaire. Plusieurs types de matériaux ont été utilisés afin de combler les imperfections des greffes allo- ou autologues lors de réparations osseuses, notamment en terme de quantité de tissu disponible, d'infection et d'inflammation (VandeVord et al., 2005). Ces biomatériaux comptent les métaux, les céramiques et les polymères. Leur but ultime est de fournir un micro-environnement capable de stimuler les activités cellulaires, afin qu'ils soient remplacés par du tissu osseux nouvellement formé. Cependant, l'utilisation isolée des métaux, céramiques ou polymères génère plusieurs problèmes, inhérents aux qualités physico-chimiques de chacun d'entre eux. Les métaux, bien qu'étant très résistants dans une utilisation aux sites supportant les charges mécaniques, subissent une corrosion après implantation (Huber et al., 2009). Les céramiques, bien que bioactives et montrant une bonne résistance à l'érosion, se trouvent être peu résistantes mécaniquement parlant (Raynaud et al., 2002). Les polymères, bien qu'étant flexibles et adaptables aux structures, ont des produits de dégradation toxiques (Eschbach, 2000). Ces différents points expliquent pourquoi ces biomatériaux ne

constituent que 10% des greffes osseuses, où les greffes allo- ou autologues restent majoritaires (Mano et al., 2004).

Sont alors apparus les matériaux composites (Figure 11). La définition traditionnelle de ce type de matériau est un composé formé d'au moins deux phases: une phase continue et une phase dispersée. La phase continue permet de combler le volume et de transférer les charges à la phase dispersée. Cette dernière permettra d'augmenter une ou plusieurs propriétés du composite, notamment les propriétés mécaniques (Mano et al., 2004). Ainsi, dans un composite, une synergie des composants a lieu, permettant de surpasser les qualités des composants isolés.



**Figure 11: Evolution de l'utilisation des biomatériaux dans les greffes osseuses.**

Au cours du temps, les découvertes ont permis d'améliorer les capacités d'ostéointégration des matériaux, jusqu'à atteindre des composés biomimétiques avec les composites et les nanocomposites.

Abréviations: HA: HydroxyApatite, TCP: TriCalcium Phosphate, PLGA: polylactic-co-glycolic acid, PE: PolyEthylene, PLLA: poly-L-lactic acid.

Source: (Stylios et al., 2007).

L'idée principale de conception de ces matériaux est l'approche biomimétique, cherchant à mimer une phase organique dans laquelle sont dispersés des minéraux composés de sels de phosphate de calcium. Ce concept d'analogie osseuse a été introduit par le britannique William Bonfield, qui créa des matériaux formés de polyéthylène, un polymère formant la matrice, et d'hydroxyapatite (HAP) (Bonfield et al., 1981). Depuis, de nombreux autres composites ont vu le jour, la matrice pouvant être métallique (Friedman et al., 1995), céramique (Roualdes et al., 2010), polymérique (Dalby et al., 2002a; Rea et al., 2004) ou biologique (Wahl and Czernuszka, 2006), la phase dispersée étant le plus souvent de l'HAP (Bonfield, 1988),

compte tenu de ses propriétés biologiques, que nous verrons par la suite (cf. B. Chapitre I-2.2.2. Effets de l'apatite ). Certains autres composites sont aussi formés d'un sandwich comprenant une couche externe de polyéthylène/HAP et un corps interne formé de fibres de carbones (Sousa et al., 2003), recréant les compartiments trabéculaires et corticaux du tissu osseux. Le plus grand avantage des matériaux composites est que l'on peut façonner leurs propriétés mécaniques et biologiques en variant la fraction de la phase discontinue (Dalby et al., 2002b; Di Silvio et al., 2002; Shishatskaya et al., 2006) ou la dimension des particules (Nazhat et al., 2000), modifiant ainsi l'acceptation du matériau au sein de l'hôte.

Plus récemment sont aussi apparus les matériaux nanocomposites (les grains d'apatite sont alors à l'échelle nanométrique et non plus micrométriques), montrés comme augmentant l'adsorption protéique et l'adhésion cellulaire (Webster et al., 2000; Webster et al., 1999), ou encore l'expression protéique et l'activité de la phosphatase alcaline chez les ostéoblastes (Ngiam et al., 2009) (

Tableau 2). L'étude in vitro des matériaux composites ou nanocomposites est primordiale à la compréhension des effets observés à l'implantation et fait l'objet de nombreuses recherches. Différents composites à base de polymères contenant de l'HAP ont ainsi été utilisés, qu'ils soit naturels, comme la gélatine (Kim et al., 2005), ou synthétiques, comme le PLGA (Chou et al., 2005a), le PCL (Rizzi et al., 2001), le PEG (Shu et al., 2003) et le PMMA (Dalby et al., 2001; Dalby et al., 2002b) (cf.

Tableau 2 pour les abréviations).

**Tableau 2: Matériaux utilisés en chirurgie orthopédique.**

Les céramiques sont des matériaux non métalliques, non organiques, nécessitant un traitement en pression et en température pour leur formation. La bioactivité est définie comme la propriété de permettre des réactions chimiques spécifiques, à l'interface matériau-tissu receveur, permettant d'établir un lien robuste. Cette caractéristique s'oppose à la bio-inertie. Un matériau biorésorbable est un matériau se dégradant au cours du temps, laissant place au tissu de l'hôte néoformé, et ne nécessitant ainsi pas de seconde intervention pour ôter le

biomatériau de son hôte. Les polymères peuvent se décomposer en trois catégories: les polymères naturels, les polymères non résorbables et les polymères résorbables. Quelques exemples sont recensés dans chacune des catégories.

<b>Métaux/Alliages</b>		TiAlV (Alliage titane-aluminium-vanadium) CoCrMo (Alliage cobalt-chrome-molybdène) Acier inoxydable
<b>Céramiques</b>	<b>Bioinerte</b>	Alumine Zircon
	<b>Bioactive</b>	HAP (hydroxyapatite)
	<b>Biorésorbable</b>	TCP (tri calcium Phosphate) BCP (biphasic calcium phosphate=HAP+TCP)
<b>Polymères</b>	<b>Naturels</b>	Collagène Fibrine Gélatine Hyaluronane Chitosane,
	<b>Non résorbables</b>	PE (polyéthylène) PEEK (polyétheréthercétone) PAEK (polyaryléthercétone) PSU (polysulfone) PET (polyéthylènetéréphtalate) POM (polyoxyméthylène) PMMA (polyméthylméthacrylate) pHEMA (polyhydroxyéthylméthacrylate)
	<b>Résorbables</b>	PHB (polyhydroxybutyrate) CPLA (copoly-L-lactide) PGA (polyglycolic acid) PLGA (polylactic-co-glycolic acid) PLA (polylactic acid) PLLA (poly-L-lactic acid) PCL (polycaprolactone) PEG (polyéthylène glycol)
<b>Composites/Nanocomposites</b>		(nano-) HAP/collagène (nano-) HAP/gélatine (nano-) HAP/chitosane (nano-) HAP/PLLA HAP/alginate HAP/PLGA HAP/PE HAP/Ti HAP/Co-Cr

Par ailleurs, de nombreuses études s'intéressant au comportement des cellules osseuses négligent la composante matricielle et dimensionnelle du tissu osseux, le support de culture *in vitro* par excellence restant le polystyrène traité pour la culture cellulaire. Cependant, certaines études ont utilisées des supports naturels, comme les surfaces osseuses dévitalisées, la dentine ou l'ivoire. La préparation et le maniement de ces supports biologiques s'avère cependant difficile. Divers supports de culture "ostéo-mimétiques" ont alors été créés, permettant de contrôler différents aspects, comme le contenu de la phase organique ou la qualité de la phase minérale. On peut compter des supports commercialisées comme BD Biocoat Osteologic™ (phosphate de calcium déposé sur différents supports) (Ariyoshi et al.,

2008) ou BONITmatrix® (87% de calcium phosphate et 13% d'oxyde de silice) (Muller et al., 2008) et de nombreux supports non commercialisés dont les méthodes de fabrication diffèrent. Nous citerons l'ACC (Apatite Collagen Complex, apatite déposée sur du collagène de type I) (Shibutani et al., 2000), utilisé dans nos études.

## **2.2. Ostéoblaste et matrice**

### **2.2.1. Effets des caractéristiques physiques de surface**

L'ostéoconduction est la capacité d'un matériau à recevoir la repousse osseuse, par ces capacités à induire l'attachement, la prolifération, la migration et l'expression phénotypique des cellules osseuses. L'ostéoinduction est la propriété d'un matériau à induire la différenciation de progéniteurs pour finalement former du tissu osseux, pouvant se produire de façon ectopique (cf. B. Chapitre I-2.3. Cellules souches mésenchymateuses et matrice). La bioactivité est définie comme la propriété d'un matériau à développer un lien avec le tissu de l'hôte. Ces quelques définitions (Ben-Nissan and LeGeros, 2008) illustrent la biocompatibilité d'un matériau, largement dépendante de ces propriétés physico-chimiques. Les ostéoblastes doivent en effet intégrer les informations biochimiques, mais aussi les informations mécaniques provenant de leur environnement, afin d'établir une réponse appropriée.

En termes de topographie, il est bien établi que les ostéoblastes répondent à la rugosité ainsi qu'à l'organisation des anfractuosités de leur support de culture. L'augmentation de la rugosité permet une augmentation de l'adhérence cellulaire (Anselme, 2000; Keller et al., 2003), de la différenciation (Hatano et al., 1999), de la production de facteurs de croissance (Kieswetter et al., 1996) et de protéines de la matrice chez les cellules ostéo-formatrices (Lincks et al., 1998; Marinucci et al., 2006). Cette rugosité a aussi été montrée comme influant sur l'expression génique globale des ostéoblastes (Brett et al., 2004). Par ailleurs, l'organisation des anfractuosités du support de culture fait débat puisque certaines études montrent, avec la diminution d'organisation, une augmentation de la prolifération (Anselme et al., 2002) et de l'adhérence (Bowers et al., 1992), alors que d'autres montrent une diminution de la prolifération (Anselme et al., 2000; Ball et al., 2008) et de l'activité métabolique (Ball et al., 2008). Ces différences reflètent le fait que les conditions de culture et de surface ne sont jamais parfaitement les mêmes entre les études (Bachle and Kohal, 2004).



La rigidité du support est aussi susceptible d'influer sur le comportement ostéoblastique. La vitesse de migration, la prolifération, et la différenciation augmentent en effet avec la rigidité du support de culture, les supports les plus mous laissant apparaître un cytosquelette d'actine (cf. B. Chapitre II-1.1.1.1. Les microfilaments) peu organisé, à l'inverse des supports rigides (Khatiwala et al., 2006). Il a été montré par la même équipe que l'effet différenciant de la dureté du support de culture passait par la phosphorylation d'un membre de la famille des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) (Khatiwala et al., 2007), famille de protéines connues pour leur rôle régulateur dans la différenciation ostéoblastique (Jaiswal et al., 2000; Xiao et al., 2000). Ce mécanisme est sous la dépendance de petites protéines de la famille des GTPases, appelées RhoA (Khatiwala et al., 2009), impliquées dans la réponse à l'environnement mécanique (Putnam et al., 2003). Ces observations concernant la rigidité du support de culture amènent à la notion de durotaxie (ou mécanotaxie), notion qui n'est pas restreinte aux ostéoblastes (Engler et al., 2004; Lo et al., 2000; Pelham and Wang, 1997). Cependant, les effets de la rigidité du support de culture dépendent aussi de la qualité de la matrice qui peut y être déposée. En effet, la migration, par exemple, devient biphasique lorsque les supports sont recouverts par une haute densité de collagène de type I, puisque faible pour les supports les plus rigides et les plus mous, et élevée pour les supports intermédiaires, laissant présager d'une intégration mécano-chimique au niveau cellulaire (Khatiwala et al., 2006).

Une autre notion à prendre en compte est l'énergie de surface (mesurée par l'angle de contact d'un liquide et ainsi directement liée à la mouillabilité). Celle-ci augmente avec l'hydrophilie du matériau. Il a été montré que l'adhérence des ostéoblastes augmente avec l'énergie de surface du matériau (Keselowsky et al., 2004; Lai et al., 2010).

On peut aussi noter l'effet de la dimensionnalité du micro-environnement, la tridimensionnalité se rapprochant plus des tissus natifs que les boîtes de culture bidimensionnelles (Pampaloni et al., 2007). La morphologie des ostéoblastes est en effet hautement affectée lorsqu'ils sont cultivés en trois dimensions. Ils émettront de longs prolongements cytoplasmiques dans le dernier cas, les faisant ressembler à des ostéocytes (Boukhechba et al., 2009; Karsdal et al., 2002; Murshid et al., 2007) et changeront leurs productions géniques vers un modèle ostéocytaire, notamment en diminuant leur expression de collagène de type I (Boukhechba et al., 2009). Dans le cas d'environnements tridimensionnels intervient la notion de porosité du matériau. La porosité du tissu osseux natif n'est en effet pas un élément à négliger, puisqu'elle représente 50 à 90% du volume osseux trabéculaire, et 3 à 12% du volume osseux cortical (cités dans (Karageorgiou and Kaplan,

2005)). La porosité des matériaux implantés est en effet nécessaire à la synthèse de tissu osseux néoformé (Kuboki et al., 1998). *In vivo*, ce sont les porosités élevées qui permettent l'ostéogénèse (Kruyt et al., 2003; Roy et al., 2003). *In vitro*, une faible porosité permettrait la différenciation alors qu'une forte porosité permettrait une meilleure prolifération, facilitant le transport de l'oxygène et des nutriments (Takahashi and Tabata, 2004).

Ainsi, la MEC, en plus d'être un support structural, fournit de nombreux signaux mécaniques à la cellule adhérente, régulant la prolifération, la différenciation, la morphologie et l'apoptose cellulaire (Vogel and Sheetz, 2006). On pourrait parler de ces signaux en termes de niche mécanique (Discher et al., 2009), une niche étant le micro-environnement régulant la survie et la différenciation des cellules *in vivo*.

### 2.2.2. Effets de l'apatite

Comme mentionné plus haut, le cycle de remodelage affectera, selon sa durée, le degré de minéralisation de la matrice osseuse entre et à l'intérieur des différents BSU (Follet et al., 2004; Meunier and Boivin, 1997) (cf. B. Chapitre I-1.2. Le remodelage osseux). Par ailleurs, l'HAP est largement utilisée en chirurgie orthopédique (Chambers et al., 2007; Oonishi, 1991) et dentaire (Browaeys et al., 2007; Iezzi et al., 2009), parmi les matériaux phospho-calciques, du fait qu'il ne déclenche pas de réaction immunitaire majeure, comparé aux allogreffes (VandeVord et al., 2005) et du fait de son excellente biocompatibilité en termes d'ostéoconduction (Boyde et al., 1999; Nandi et al., 2008; Soballe et al., 1991) et d'ostéoinduction (Habibovic et al., 2006; Lin et al., 2009), permettant sa bioactivité (Kamitakahara et al., 2007). Ainsi, physiologiquement et cliniquement, les cellules ostéoblastiques sont confrontées au minéral osseux.

Afin de mieux comprendre les caractéristiques de bioactivité de l'HAP, de nombreuses études se sont attachées à comprendre les mécanismes d'action de l'HAP sur l'ostéoblaste. Leur différenciation est augmentée en présence d'HAP (souvent mesurée par l'expression ou l'activité de la phosphatase alcaline), mais selon les études, cette différenciation est (Dalby et al., 2001; Dalby et al., 2002b; Kim et al., 2005; Matsumura et al., 2009; Zambonin et al., 2000) ou n'est pas (Chou et al., 2005b; Ramires et al., 2001; Shu et al., 2003; Sibilla et al., 2006) couplée à une augmentation de la prolifération. Ces différences illustrent probablement, ici aussi, l'absence de similitude parfaite entre les conditions de culture et de

surface. L'activité des ostéoblastes est augmentée sur les supports contenant de l'HAP, en termes de consommation d'oxygène (Rizzi et al., 2001), de synthèse de collagène de type I (Ramires et al., 2001) ou d'ostéocalcine (Matsumura et al., 2009; Shu et al., 2003) et de synthèse de métalloprotéinases, protéines permettant la dégradation de la MEC (Zamboni et al., 2000). Des changements morphologiques ont aussi été décrits lors de la culture d'ostéoblastes sur HAP, avec l'apparition de protrusions cytoplasmiques (Chou et al., 2005b; Richard et al., 2006; Xu et al., 2008), semblables à celles obtenues en environnement tridimensionnel. Il est aussi largement reconnu que l'HAP permet l'adsorption des protéines (El-Ghannam et al., 1999; Kilpadi et al., 2001; Woodruff et al., 2007), augmentant l'adhésion ostéoblastique (Dalby et al., 2002b). Cette augmentation de l'adhésion cellulaire est primordiale, car conditionne la biocompatibilité du matériau (Anselme, 2000; Brunton et al., 2004).

Le matériau HAP a aussi été montré comme légèrement cytotoxique pour les ostéoblastes (Chou et al., 2005b). Cette toxicité peut venir de la mise en solution trop importante d'ions calcium (Saunders et al., 2007). A l'inverse, les ions calcium ont aussi été montrés comme augmentant l'expression de la phosphatase alcaline, de l'ostéopontine et de la sialoprotéine osseuse (Jung et al., 2010). Le phosphore, composant lui aussi l'HAP, se trouve en solution sous forme de phosphates inorganiques, formes ioniques présentes lors de la formation des cristaux ou de leur désagrégement. Ces ions produisent eux aussi un effet non négligeable sur les productions matricielles de l'ostéoblaste. En effet, les phosphates inorganiques, libérés par l'activité de la phosphatase alcaline, augmentent l'expression et la synthèse d'ostéopontine par les ostéoblastes (Beck et al., 2000). Cette molécule ayant des propriétés anti-minéralisantes (Hunter et al., 1996; McKee and Nanci, 1996), un rôle physiologique d'arrêt de la minéralisation peut être attribué aux ions étudiés, si trop de phosphates inorganiques sont en solution. Il a aussi été montré que les phosphates inorganiques diminuaient l'expression de plusieurs types de collagènes, dont le type I (Beck et al., 2003). Ainsi, le phosphate inorganique, selon sa concentration et la durée d'exposition (Beck, 2003) (plus la durée d'exposition est longue, moins la concentration doit être élevée pour obtenir des effets), pourrait permettre de signaler à l'ostéoblaste la fin de sa phase de synthèse et le début de la minéralisation de la MEC.

### **2.3. Cellules souches mésenchymateuses et matrice**

L'apatite affecte aussi le comportement des cellules souches mésenchymateuses, précurseurs des ostéoblastes (cf. B. Chapitre I-1.1.2.1. Les cellules ostéoblastiques). Bien qu'étant légèrement cytotoxique ici aussi (Liu et al., 2007a), comparé aux conditions de culture standard sur polystyrène traité, la minéralisation augmente la différenciation ostéoblastique des cellules souches mésenchymateuses en terme de production (Oreffo et al., 1998), d'expression (Anada et al., 2008; Lin et al., 2009) ou d'activité de la phosphatase alcaline (Sun et al., 2008). En supplément a été observée une augmentation d'expression de ostérix, facteur de différenciation ostéoblastique (cf. B. Chapitre I-1.1.2.1. Les cellules ostéoblastiques) (Anada et al., 2008). La minéralisation du support de culture augmente aussi l'expression et la production d'ostéocalcine (Lin et al., 2009; Liu et al., 2007a; Muller et al., 2008; Okamoto et al., 2006), de collagène de type I (Anada et al., 2008; Lin et al., 2009; Muller et al., 2008) et d'ostéopontine (Sun et al., 2008) chez ces cellules, bien que cette augmentation de production de facteurs matriciels ne soit que tardive (Liu et al., 2007a). Ces études montrent que le minéral apatite possède un potentiel ostéoinducteur, tel qu'il a été défini par Friedenstein il y a 40 ans (Friedenstein, 1968). Le minéral diminue la prolifération de ces cellules (Anada et al., 2008; Oreffo et al., 1998; Rosa et al., 2003). Il a été montré que les propriétés de surface de l'apatite seule permettait la différenciation ostéoblastique, sans ajout de facteurs différenciant dans le milieu de culture (Muller et al., 2008). Le milieu conditionné de cellules souches cultivées sur apatite a aussi des propriétés différenciantes sur des cellules souches cultivés sur polystyrène traité, montrant qu'un facteur soluble pro-différenciant est relargué (Lin et al., 2009).

Par ailleurs, deux études capitales ont montré l'influence de la morphologie cellulaire et de la rigidité de la surface de culture sur la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (cf. B. Chapitre I-1.1.2. Les cellules osseuses). Tout d'abord, l'équipe de Christopher Chen a montré l'influence de la forme cellulaire et l'importance des petites protéines à activité GTPase sur la différenciation des cellules souches mésenchymateuses. En effet, cette étude montre que si une cellule souche est ronde, elle empruntera la voie de différenciation adipocytaire alors que si elle est étalée, la voie de différenciation ostéogénique sera employée. Ceci est sous la dépendance de RhoA (et dépendant de l'activation de la myosine de type II et la genèse de tension cellulaire qu'elle contrôle (cf. B. Chapitre II-1.1.1.1. Les microfilaments)), dont l'inhibition engage les cellules souches vers la voie adipocytaire et

dont la surexpression engage la différenciation ostéoblastique, quelque soit la forme cellulaire (McBeath et al., 2004).

L'équipe de Dennis Discher a pour sa part montré l'influence de la rigidité du support de culture sur l'engagement des cellules souches mésenchymateuses dans une voie de différenciation. Les matrices molles engagent les cellules vers la voie neurogénique alors que les matrices dures les engagent vers la voie ostéogénique. Les matrices de rigidité intermédiaire engagent les cellules souches mésenchymateuses vers la voie musculaire. L'effet de la rigidité de ces différentes matrices est ainsi en accord avec la rigidité des différents tissus *in vivo*. De plus, cet effet différenciant passe aussi par la myosine de type II (cf. B. Chapitre II-1.1.1.1. Les microfilaments) (Engler et al., 2006).

Que ce soit pour les ostéoblastes ou leurs précurseurs mésenchymateux, l'aspect mécanique de la cellule à la matrice semble ainsi revêtir une grande importance dans le comportement général et l'engagement dans les voies de différenciation.

## **Chapitre II. Aspects mécaniques de la cellule au tissu osseux**

### **1. La cellule: un centre d'intégration mécanique**

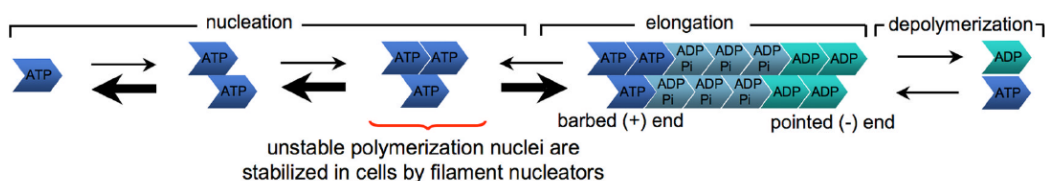
#### **1.1. La mécanique cellulaire**

##### **1.1.1. Le cytosquelette**

Bien que la présence de "fibres" comme éléments de base du vivant ait été suspecté depuis les philosophes présocratiques (Frixione, 2000), puis identifiés à l'intérieur des muscles au cours des siècles, notamment par Antoni Philips Van Leeuwenhoek (Van Leeuwenhoek, 1682), savant néerlandais, qui avait noté la hiérarchisation des structures sous forme de fibres, il faudra attendre la fin du 19<sup>ème</sup> siècle pour que Walther Flemming, biologiste allemand, fasse une des premières allusions à des fibres intracellulaires, dans ces travaux relatifs à la division cellulaire (Flemming, 1880). Ce ne fut alors qu'en 1931 que le terme de cytosquelette fut proposé par le français Paul Wintrebert. Cet embryologiste, s'interrogeant sur le fait que les œufs de crapauds gardaient leur organisation interne malgré leur parcours tortueux le long du tractus génital des femelles, conclura à la nécessité physique d'un squelette cellulaire (Wintrebert, 1931). L'arrivée de la microscopie électronique dans les années 1950 va alors permettre l'identification des composants de ce cytosquelette. Il regroupe plusieurs protéines formant un échafaudage dans le cytoplasme des cellules eucaryotes et même procaryotes (Shih and Rothfield, 2006). C'est une structure dense et dynamique présente dans la totalité du cytoplasme de la cellule qui permet de maintenir la forme de la cellule, permet ses mouvements (cf. B. Chapitre II-1.1.2. La migration cellulaire) et joue un rôle important dans les transports intracellulaires, les divisions cellulaires et la traduction d'un signal mécanique en signal biologique (cf. B. Chapitre II-1.2. La mécano-traduction). Trois grands types de structures le composent: les microfilaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires. Nous n'allons ici décrire que les deux premiers composants, les filaments intermédiaires ayant été écartés de notre étude de par leur contribution historiquement moins connue et moindre dans la dynamique cellulaire, que les deux autres constituants (Coulombe et al., 2000; Helfand et al., 2004).

### 1.1.1.1. Les microfilaments

L'actine-G, protéine globulaire de 42kDA, est l'unité de base des microfilaments. C'est aussi une des protéines les plus représentées dans la plupart des cellules eucaryotes. Les monomères d'actine se polymérisent spontanément, dans des conditions physiologiques, et forment des oligomères, qui représentent des foyers de nucléation (Pollard and Cooper, 2009). Ces oligomères sont instables *in vivo*, et nécessitent l'intervention de différentes protéines liant l'actine (voir ci-dessous). Si la concentration en monomère d'actine dépasse un seuil critique, les foyers de nucléation d'actine-G permettent la formation de longs et stables filaments hélicoïdaux, nommés actine-F, ou actine fibrillaire, ayant un tour d'hélice de 13 monomères et dont le diamètre se situe entre 3 nm et 8 nm. L'hydrolyse de l'ATP par l'actine elle-même, qui possède un site de fixation au sein de sa structure, résulte en la dépolymérisation des filaments. De plus, les filaments d'actine sont polarisés, car les sous-unités d'actine-G sont orientées uniformément, proposant ainsi à chacune des extrémités du filament une face différente de la molécule d'actine. En effet, le microfilament possède une extrémité à croissance rapide (extrémité + ou "barbed end", appelée ainsi en raison de la présence de têtes de myosine à sa surface, nous y reviendront) et une extrémité à croissance lente, qui est le siège préférentiel de la perte de monomères (extrémité – ou "pointed end") (Figure 12).



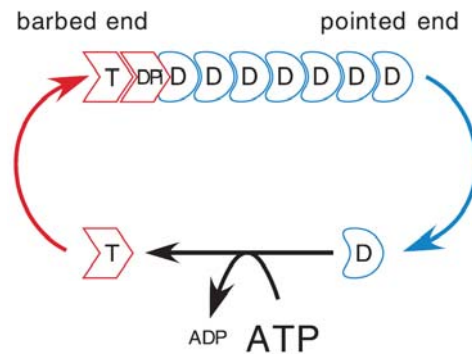
**Figure 12: Nucléation et élongation de l'actine.**

Les dimères et les trimères d'actine-G sont formés spontanément par nucléation mais sont instables (toutefois, ils peuvent être stabilisés par certaines protéines se liant à l'actine). Une fois stabilisés, les oligomères peuvent s'allonger en de plus long polymères hélicoïdaux qui croissent rapidement à l'extrémité + et plus lentement à l'extrémité –. L'hydrolyse de l'ATP par l'actine permet la dépolymérisation des microfilaments.

Source: (Dominguez, 2009).

Le microfilament présente ainsi une capacité d'allongement à son extrémité +, grâce à une dépolymérisation de monomères provenant de l'extrémité –, suivant la concentration en monomère d'actine et la présence d'ATP. Ce phénomène est connu sous le nom de "treadmilling", ou tapis roulant (Wegner, 1976) (Figure 13). Les monomères actine-ADP sont dissociés de l'extrémité – tandis que les monomères actine-ATP sont associés au niveau de

l'extrémité +. L'hydrolyse de l'ATP est ainsi essentielle au maintien du mécanisme de "treadmilling" (Fujiwara et al., 2002).



**Figure 13: Mécanisme de "treadmilling" de l'actine.**

Mécanisme de polymérisation de l'actine en tapis roulant. Le désassemblage des monomères d'actine à l'extrémité - contrôle la quantité d'actine-ATP et donc l'élongation de l'extrémité +. T: actin G-ATP, D: actin G-ADP, Dpi: actin G-ADP+Pi.

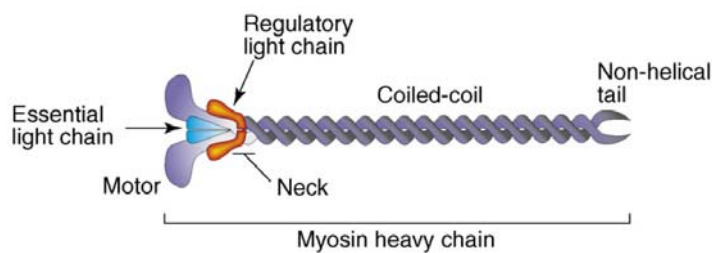
Source: (Pantaloni et al., 2001).

Comme dit plus haut, la polymérisation, et même la dépolymérisation de l'actine sont contrôlées par différentes protéines. Il a été recensé près de 160 de ces protéines, nommés ABP ("Actin Binding Proteins") (dos Remedios et al., 2003). Différentes classes fonctionnelles peuvent être établies, avec, entre autres, des protéines de coiffe (ARP2/3, formin) qui vont se fixer spécifiquement à l'une des extrémités du microfilament et ont un rôle dans la nucléation ou la polymérisation, des ABP stabilisatrices de filaments (tropomyosine), ou encore des ABP qui vont séquestrer l'actine-G, permettant ainsi de maintenir un pool de monomères (thymosine  $\beta$ 4, profiline). Il existe également des protéines motrices (myosine), qui permettent de générer des déplacements (donc des forces) le long des microfilaments d'actine. Ces dernières protéines ont ainsi un rôle majeur dans la migration cellulaire et le transport d'organites ou de vésicules. D'un point de vu historique, l'actine a d'ailleurs en premier lieu été décrite par ses capacités de coagulation de préparations de myosine (Straub, 1943).

La myosine a en effet été découverte auparavant dans le muscle et son nom lui a été donné en 1864 (Kühne, 1864), de part son omniprésence dans le muscle. Cette molécule, décrite par la suite dans d'autres types cellulaires (Pollard and Weihing, 1974), se déplace le long des microfilaments et génère des forces de tension grâce à l'hydrolyse de l'ATP. Basé sur l'analyse phylogénétique, 24 classes de myosines ont été catégorisées (Foth et al., 2006). La myosine de type II, ou myosine conventionnelle, catégorie la plus représentée et la plus étudiée dans les cellules musculaires et non musculaires, est une protéine formée de trois paires de peptides



(hexamère): deux chaînes lourdes de 230 kDa (MHC pour Myosin Heavy Chains) contenant un domaine moteur à l'extrémité N-terminale (qui permet l'interaction avec l'actine), deux chaînes légères (MLC pour Myosin Light Chain) de 17 kDa dites essentielles (ELC pour Essential Light Chain ou MLC1), qui stabilisent la structure des chaînes lourdes et deux chaînes légères de 20 kDa dites régulatrices (RLC pour Regulatory Light Chain ou MLC2), qui régule l'activité ATPase de la myosine (Vicente-Manzanares et al., 2009) (Figure 14). L'interaction avec l'actine se fait au niveau des chaînes légères. Le fonctionnement de cette protéine est bloqué par la blebbistatine, qui inhibe plus particulièrement l'activité ATPase de la myosine de type II (Kovacs et al., 2004).

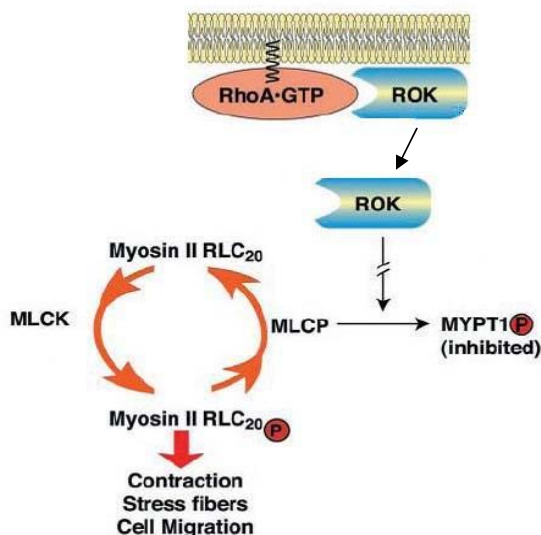


**Figure 14: Représentation schématique de la myosine II.**

La paire de chaîne lourde présente à son domaine N-terminal le domaine moteur, où se situe l'ATP, et l'interaction avec l'actine. Le cou de la protéine (neck) sert de bras de levier afin de générer le mouvement du domaine moteur. Les chaînes légères interagissent avec le cou de la protéine. La chaîne lourde est constituée de deux chaînes s'enroulant l'une autour de l'autre, jusqu'à finir par une zone non enroulée à l'extrémité C-terminale. Source: (Clark et al., 2007).

L'organisation particulière que forment les arrangements serrés de microfilaments d'actine sur lesquels circule la myosine de type II est appelé "fibres de stress". Ces fibres sont, comme les fibres musculaires, dotées de capacités de contraction (Giuliano and Taylor, 1990). La fonction des fibres de stress dans une cellule n'est pas encore bien comprise, mais il est clair que leur formation est liée à un état de tension. En effet le détachement des cellules de leur support de culture va entraîner la disparition de ces structures. De même, les fibres de stress seront absentes dans les cellules migrantes, hormis aux points de génération de contraction (cf. B. Chapitre II-1.1.2. La migration cellulaire). Par ailleurs, les fibres de stress sont reliées à la membrane par leur association avec les plaques d'adhésion (cf. B. Chapitre II-1.1.3.2. Les plaques d'adhésion), leur conférant un rôle potentiel dans la traduction des signaux mécaniques en signaux biologiques (cf. B. Chapitre II-1.2. La mécano-traduction). L'état de tension des fibres de stress est dû à l'activation de la myosine, par la phosphorylation de sa chaîne légère régulatrice, MLC2 (Kamm and Stull, 1985; Moussavi et al., 1993), amenant à

l'augmentation de l'activité ATPase de la myosine en présence d'actine (Somlyo and Somlyo, 2003). Cette phosphorylation s'opère principalement de deux manières: soit par l'intermédiaire d'une petite protéine de la famille des GTPases, RhoA, qui active sa kinase, nommée ROCK ou ROK (Rho Kinase) (Amano et al., 1996), soit par l'intermédiaire de la kinase de la myosine, appelée MLCK (Myosin Light Chain Kinase) (Hathaway and Adelstein, 1979) (Figure 15). Il est intéressant de noter que la régulation des fibres de stress se situe au centre de la cellule en cas d'activation par ROCK et en périphérie de la cellule en cas d'activation par MLCK (Totsukawa et al., 2000).



**Figure 15: Voies principales de phosphorylation de la chaîne légère régulatrice de la myosine (20kDa) ou MLC2.**

La phosphorylation de la chaîne légère régulatrice de la myosine, de 20kDa, va permettre la genèse des fibres de stress et d'autres activités cellulaires. Cette phosphorylation est permise par ROCK (ou ROK) qui, activé par RhoA, va inactiver la phosphatase de la myosine (MLCP pour Myosin Light Chain Phosphatase) par phosphorylation de son site MYPT1 (Myosin Phosphatase Targeting Subunit). La phosphorylation de MLC2 (RLC<sub>20</sub>) peut aussi être effectuée directement par l'action de la MLCK (Myosin Light Chain Kinase) ou de ROCK.

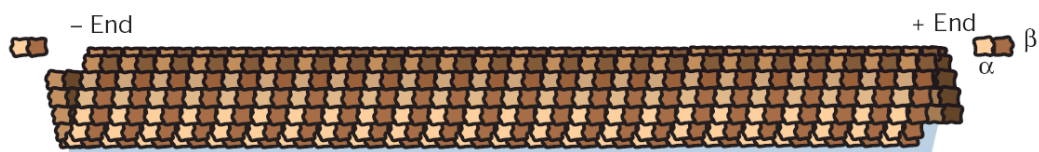
Source: adapté de (Somlyo and Somlyo, 2003).

### 1.1.1.2. Les microtubules

Les microtubules ont été nommés comme tels en 1963 (Slautterback, 1963). Ce sont les plus grosses structures du cytosquelette puisqu'ils forment un cylindre creux de 15 à 25 nm de diamètre. Ce sont d'ailleurs les seules structures du cytosquelette à posséder une lumière centrale. Ce cylindre est constitué de protofilaments hétérodimériques (en principe 13), composés de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de tubuline, dans lesquels la sous-unité  $\beta$  d'un dimère de tubuline est reliée à la sous-unité  $\alpha$  du dimère suivant (Howard and Hyman, 2003). Les

tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  sont des protéines globulaires de 55 kDa qui peuvent s'associer au GTP, la tubuline  $\alpha$  étant la seule à pouvoir l'hydrolyser en GDP (Nogales et al., 1999). Cette hydrolyse est nécessaire à la dépolymérisation du microtubule, la polymérisation étant uniquement permise par la grande affinité des dimères de tubuline-GTP vis-à-vis des extrémités (Hyman et al., 1992).

A l'instar des microfilaments, et du fait de la polarisation des sous-unités de tubulines, la polymérisation des microtubules est polarisée, avec une extrémité à croissance rapide (+), déterminée par la présence de tubuline  $\beta$  (Mitchison, 1993) et une extrémité à croissance lente (-), déterminée par la présence de tubuline  $\alpha$  (Figure 16). Les microtubules oscillent ainsi entre des phases d'élongation et de raccourcissement dans un phénomène de "treadmilling" semblable à celui des microfilaments (Rodionov and Borisy, 1997) et un mécanisme nommé "instabilité dynamique" (Mitchison and Kirschner, 1984). Le "treadmilling" indique que la perte d'une sous-unité à une extrémité - est compensée par l'addition d'une sous-unité à l'extrémité +, alors que le phénomène d'instabilité dynamique désigne la perte et l'addition d'une sous-unité à la même extrémité (soit +, soit -). Ce dernier comportement voit alterner des phases dites de "catastrophe" (décroissance brusque) et des phases dites de "sauvetage" (croissance) (Howard and Hyman, 2003).



**Figure 16: Représentation d'un microtubule.**

Les extrémités +, déterminées par la présence de tubuline  $\beta$ , sont en croissance rapide et les extrémités - des protofilaments, déterminées par la présence de tubuline  $\alpha$ , sont en croissance lente.

Source: (Howard and Hyman, 2003).

Par ailleurs, les microtubules peuvent regrouper leurs extrémités - au niveau d'un centre organisateur (MTOC pour MicroTubule Organizing Center) dans les cellules animales. Le principal MTOC est appelé centrosome, structure microtubulaire importante dans la mitose, puisqu'à l'origine du fuseau mitotique, qui permet l'alignement des chromosomes puis leur ségrégation (Scholey et al., 2003). Il a été montré que seulement 10-20% des microtubules ont leur extrémité - fixé au centrosome (Waterman-Storer and Salmon, 1997).

De plus, les microtubules sont associés à des protéines, autre similitude avec les microfilaments. En particulier deux familles de moteurs moléculaires, les dynéines et les kinésines (Hirokawa, 1998), présentent la capacité d'hydrolyser l'ATP. L'énergie qu'elles en

retirent leur permet de se mouvoir le long de ces polymères. Les dynéines sont des protéines de 1200 kDa se déplaçant vers l'extrémité -. A l'inverse, les kinésines, protéines de 380 kDa se déplacent vers l'extrémité +. Le long des rails fournis par les microtubules, ces molécules permettent ainsi le déplacement du noyau de la cellule, de complexes d'ARNm, d'organites, des filaments intermédiaires, etc. Les microtubules assurent donc aussi une fonction de transport, essentielle à la vie de la cellule.

Il existe par ailleurs de nombreuses interactions entre les microtubules et les microfilaments. Ces deux structures présentent en effet un antagonisme certain, puisque l'inhibition de l'un engendre l'activation de l'autre (Danowski, 1989). Cet antagonisme peut être expliqué de plusieurs façons. Tout d'abord, les transports cellulaires liés aux microtubules peuvent délivrer des régulateurs de la dynamique du microfilament d'acto-myosine (Huang et al., 1999a; Rodriguez et al., 2003). Les microtubules peuvent aussi séquestrer des activateurs de la contractilité (Chang et al., 2008). Ils sont aussi considérés comme des structures compressées, résistants aux structures générant les contractions que sont les microfilaments (Brangwynne et al., 2006), aspect plus amplement décrit par la suite (cf. B. Chapitre II-1.1.4. La tenségrité).

Les microtubules et les microfilaments sont par ailleurs des structures indispensables à la migration cellulaire.

### 1.1.2. La migration cellulaire

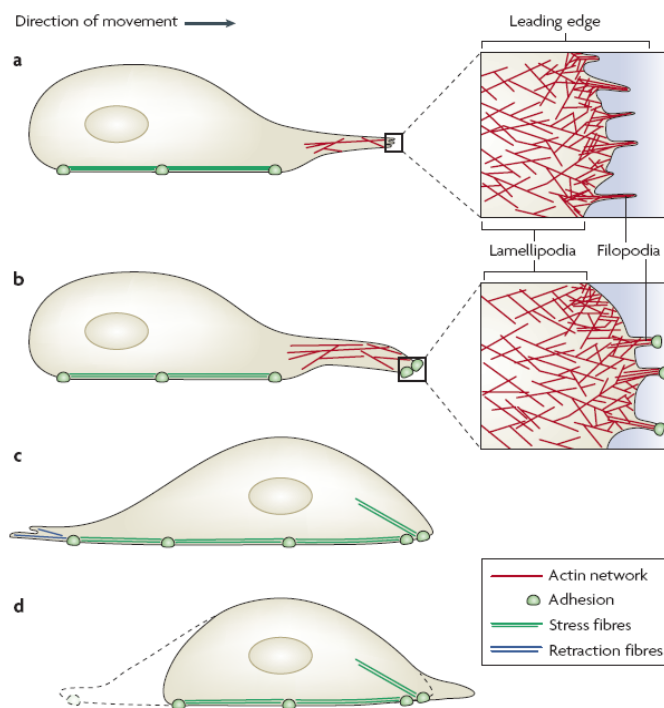
La migration cellulaire est un processus aussi complexe que nécessaire à la vie des organismes, même les plus simples. Ce phénomène intervient dès les premières étapes et tout au long de la vie. En effet, la migration cellulaire débute lors de phénomènes aussi précoces que l'implantation et le développement de l'embryon. Durant la gastrulation par exemple, de larges groupes de cellules migrent de façon coordonnée pour former les trois feuillets embryonnaires (Thiery et al., 1985). Ensuite, les cellules migrent de ces feuillets afin d'atteindre une destination précise où elles vont trouver l'environnement pour se différencier et ainsi former les différents tissus et organes. Des phénomènes migratoires sont également observés dans les organismes adultes, notamment lors du renouvellement de la peau ou des intestins, dans la réparation des tissus lésés, dans la surveillance et la réponse immunitaire (Ridley et al., 2003). En effet, les leucocytes, par exemple, doivent posséder une grande capacité de migration pour pouvoir passer de la circulation aux différents tissus, soit lésés,

soit envahis de micro-organismes, afin de détruire les cellules infectées et/ou nettoyer les débris organiques. Lors du passage de la circulation aux tissus, dans le processus de diapédèse, les leucocytes doivent être capables de changer de forme et de se déplacer dans une certaine direction, en réponse aux signaux qu'ils reçoivent de leur environnement (hormones, facteurs de croissance, cytokines).

Une régulation aberrante de la migration conduit à l'apparition de pathologies, comme les maladies cardiovasculaires (Schachter, 1997), les maladies d'inflammation chronique comme l'arthrite rhumatoïde ou la sclérose en plaques (Norman and Hickey, 2005) ou encore certaines pathologies mentales (Church et al., 2002). Les plus connus de ses mauvaises régulations de la migration sont certainement les cancers et leurs phénomènes associés, les métastases (Geiger and Peeper, 2009). Dans ce cas, les cellules tumorales se détachent de la tumeur primaire pour se disséminer à travers l'organisme via le réseau sanguin, et se réimplanter dans d'autres tissus.

Les cellules adhérentes vont migrer en fonction de plusieurs particularités présentes dans leur environnement. En effet l'attraction de la cellule sera dictée de façon graduelle par la chimotaxie en réponse à des facteurs solubles, l'haptotaxie en réponse à des molécules d'adhésion de la MEC (Carter, 1965), l'électrotaxie en réponse aux champs électriques (Zhao, 2009) ou encore à la durotaxie (Lo et al., 2000), en réponse à la rigidité du support de culture. Quoiqu'il en soit, la migration des cellules adhérentes peut être conceptualisée par un processus cyclique (Lauffenburger and Horwitz, 1996) dépendant de la dynamique du cytosquelette (Pollard and Borisy, 2003). La cellule, dans un premier temps, se polarise face à des signaux extracellulaires, en émettant des prolongements cytoplasmiques dans la direction de l'axe de migration. Ces protrusions, ou pseudopodes, sont formées par la polymérisation polarisée de l'actine où l'extrémité + du microfilament est dirigée vers la membrane plasmique, permettant l'extension de la cellule (Pollard and Borisy, 2003). Elles peuvent prendre la forme de feuillets, comme les lamellipodes, protrusions de plusieurs  $\mu\text{m}$  de largeur et de longueur et 0.1 - 0.2  $\mu\text{m}$  d'épaisseur (Mogilner and Keren, 2009), formées par un réseau de filaments d'actine courts, ou alors d'extensions ressemblants à des doigts, comme les filopodes, protrusions de 0.2-0.4  $\mu\text{m}$  de largeur, 5-35  $\mu\text{m}$  de longueur et 0.1 – 0.3  $\mu\text{m}$  d'épaisseur (Jacinto and Wolpert, 2001), formées de longs filaments d'actine parallèles et serrés. Les filopodes se trouvent souvent inclus dans le lamellipode ou s'étendent à partir de celui-ci (Lewis and Bridgman, 1992) mais peuvent aussi se former seuls (Steffen et al., 2006). C'est la présence de régulateurs de la polymérisation de l'actine (cf. B. Chapitre II-1.1.1.1. Les

microfilaments) qui déterminera quelle structure pseudopodiale sera mise en place (Chhabra and Higgs, 2007). Les extensions cytoplasmiques sont stabilisées, dans un deuxième temps, par des adhésions avec la MEC (cf. B. Chapitre II-1.1.3.2. Les plaques d'adhésion), par l'intermédiaire de récepteurs transmembranaires liés à l'actine, notamment les intégrines (cf. B. Chapitre II-1.1.3.1. Les intégrines). Ces points d'ancrages permettent, dans un troisième temps, l'établissement de sites de traction (Beningo et al., 2001), permettant à la cellule de se déplacer vers l'avant. De nouveaux contacts vont alors s'établir à l'avant de la cellule (turnover), avec le désassemblage d'autres sites d'adhésion en arrière de la cellule (Webb et al., 2002) permettant, en fin de cycle, la rétraction de la partie postérieure, grâce à des forces de traction liées à la myosine de type II des fibres de stress (Worthylake and Burridge, 2003; Xu et al., 2003) (Figure 17).



**Figure 17: Les différentes étapes de la migration cellulaire et les différentes protrusions.**

(a) La migration débute par la polarisation de la cellule avec l'établissement de protrusions à l'avant de la cellule, composées de lamellipodes et de filopodes. (b) Durant l'extension de la membrane plasmique, de nouvelles adhésions s'établissent sous l'avant de la cellule. (c) Ensuite, le noyau et le corps cellulaire sont traduits vers l'avant grâce aux forces générées par les filaments d'acto-myosine des fibres de stress sur le support de culture, via des sites d'adhésions. (d) Enfin, l'arrière de la cellule est rétracté grâce au désassemblage des adhésions à ce site.

Source: (Mattila and Lappalainen, 2008)

La structure des extensions cytoplasmique sous-tend leur fonction. En effet, les larges éléments de membranes plasmiques élaborés par les lamellipodes forment la base de la

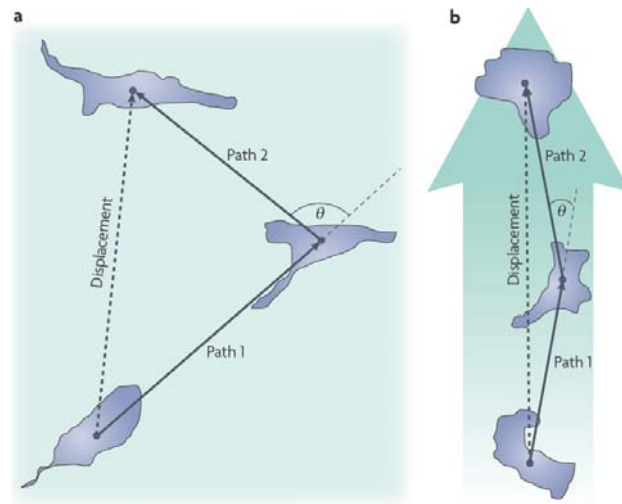
migration directionnelle (Pollard and Borisy, 2003; Ponti et al., 2004). Au contraire, les fins prolongements des filopodes sont souvent décrits comme des antennes servant à la détection et à l'exploration de l'environnement (Davenport et al., 1993; Mattila and Lappalainen, 2008).

Les Rho-GTPases, abordées précédemment (cf B. Chapitre II-1.1.1.1. Les microfilaments) sont des régulateurs centraux de la formation des protrusions. Cdc42 a notamment un rôle très important dans la polarisation de la cellule, étant donné que son inhibition ou son activation abroge la directionalité de la migration (Etienne-Manneville and Hall, 2002). De plus, Rac1 et cdc42, ont un rôle primordial dans l'élaboration des lamellipodes et des filopodes, respectivement (Ridley, 2006). Par ailleurs, une cellule présentant des fibres de stress à un endroit (cf B. Chapitre II-1.1.1.1. Les microfilaments) ne peut présenter de protrusions dans cette même zone, car RhoA, générateur de fibres de stress, et rac, générateur de lamellipodes, s'inhibent réciproquement (Evers et al., 2000). Ainsi la formation de lamellipodes va inhiber la formation de fibres de stress à l'avant de la cellule, alors que le phénomène inverse se produit à l'arrière de la cellule (Worthylake and Burridge, 2003; Xu et al., 2003).

Les microtubules jouent aussi un rôle important dans la migration cellulaire. En effet, ils participent largement à la définition de la polarité (Small et al., 2002; Small and Kaverina, 2003), la protrusion elle-même pouvant être sous leur contrôle car leur polymérisation active Rac1 (Kunda et al., 2001; Waterman-Storer et al., 1999). L'apport de matériel membranaire à la protrusion en formation est aussi un rôle soutenu par les microtubules (Toomre et al., 1999). De plus, en permettant le désassemblage des adhésions à l'arrière de la cellule, les microtubules initient l'étape de rétraction (Ballestrem et al., 2000).

L'intervention des RhoGTPases et le jeu des microfilaments et des microtubules montrent ainsi que le processus de migration est fait de contrôles réciproques locaux, amenant à un comportement global de la cellule.

Ce comportement migratoire cellulaire global est défini principalement par deux moyens: la vitesse et la directionalité de la migration (Gail and Boone, 1970). Le premier paramètre décrit simplement la distance parcourue par la cellule en un certain temps. Le deuxième est relatif au parcours de la cellule sur son support (Figure 18). Deux comportements de directionalité ont été décrits. On distingue la migration dite aléatoire de la migration dite persistante (Petrie et al., 2009).



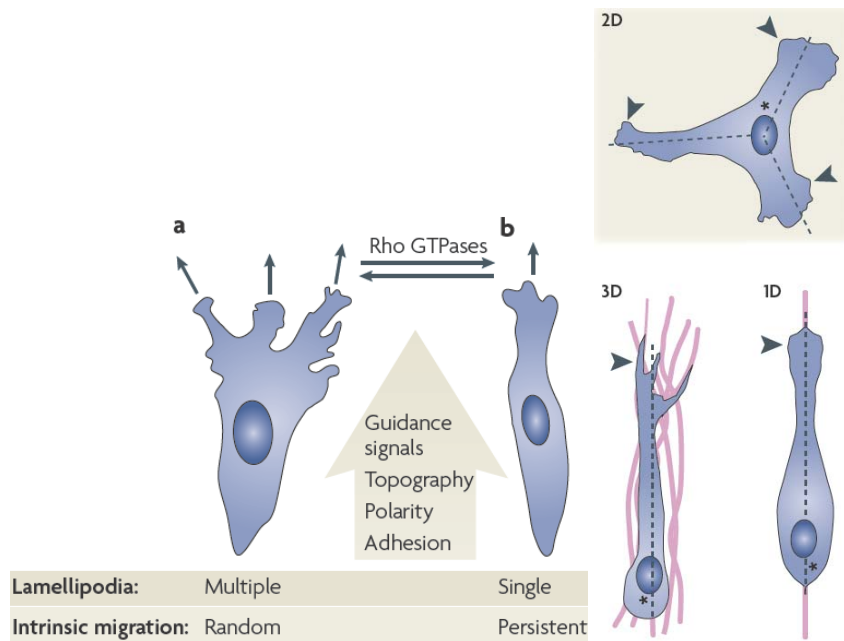
**Figure 18: Directionnalité de la cellule.**

La chémotaxie définit une attraction de la cellule par un facteur soluble. Si ce facteur a une concentration uniforme dans le milieu environnant, la cellule présentera le comportement migratoire aléatoire représenté en (a) à trois temps différents. Si le facteur soluble présente une concentration graduelle dans le milieu environnant, la cellule présentera le comportement migratoire persistant représenté en (b) à trois temps différents. A chaque temps, la migration peut être définie par la distance parcourue entre les positions (path), par l'angle d'orientation de la migration ( $\theta$ ) et par la distance euclidienne, c'est-à-dire la distance parcourue à vol d'oiseau entre le point initial et le point final de la migration (displacement). Ces informations permettent de définir vitesse et directionnalité de la migration, cette dernière étant définie par la distance euclidienne (displacement) divisée par la distance totale parcourue ( $\Sigma path$ ). Ainsi, si une cellule migre de façon aléatoire, sa directionnalité décroîtra, celle-ci augmentant en migration persistante.

Source: (Petrie et al., 2009).

Ces types de migrations dépendent de la présence de pseudopodes en avant de la cellule (Arriemerlou and Meyer, 2005), eux mêmes sous contrôle des RhoGTPases (voir plus haut). Une augmentation du nombre de protrusions latérales va engendrer une migration aléatoire résultant en une capacité réduite de réponse directionnelle aux événements environnementaux. A l'inverse, si les protrusions latérales sont restreintes, comme lorsque les cellules sont cultivées en "1D" (c'est-à-dire dans des lignes) ou sur des fibres matricielles orientées en "3D" (Doyle et al., 2009), un front cellulaire unique sera établi, autorisant une migration persistante permettant une réponse directionnelle rapide aux événements environnementaux. De multiples facteurs de l'environnement vont déterminer le comportement migratoire de la cellule, comme mentionné en début de section (facteurs solubles, qualité de la MEC, champs électriques, rigidité ou topographie du support de culture) (Figure 19). La cellule intégrera ainsi ces différents signaux afin de privilégier un axe de migration.





**Figure 19: Définition du type de migration suivant la localisation des lamellipodes.**

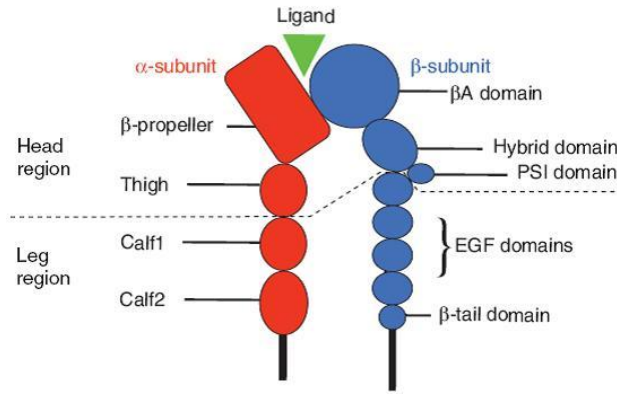
La localisation des lamellipodes, sous contrôle des RhoGTPases, va dicter le comportement migratoire de la cellule. (a) Si de multiples lamellipodes sont formés aléatoirement autour de la cellule, la cellule aura une migration aléatoire. (b) Si un lamellipode unique est formé au front de la cellule, une migration persistante sera observée. Plusieurs facteurs affectent la directionnalité de la migration, dont les restrictions topographiques du support de culture. En effet, la culture bidimensionnelle (2D) engendre une migration aléatoire (plusieurs axes directionnels représentés par les lignes pointillées) alors que les cultures en environnement tridimensionnel (3D) ou unidimensionnel (1D) privilégieront une migration persistante (un seul axe directionnel).  
 Source: (Petrie et al., 2009).

Les cellules adhérentes présentent par définition des points de contacts avec leur support de culture, points de contacts dont l'assemblage et le désassemblage sont primordiaux dans la migration cellulaire, comme nous venons de le voir.

### 1.1.3. L'adhésion cellulaire

#### 1.1.3.1. Les intégrines

Les intégrines sont des complexes hétérodimériques glycoprotéiques transmembranaires composés d'une longue partie extracellulaire et d'une courte partie intracellulaire, permettant de lier le milieu extérieur (MEC, autre cellule) au cytosquelette (Figure 20).

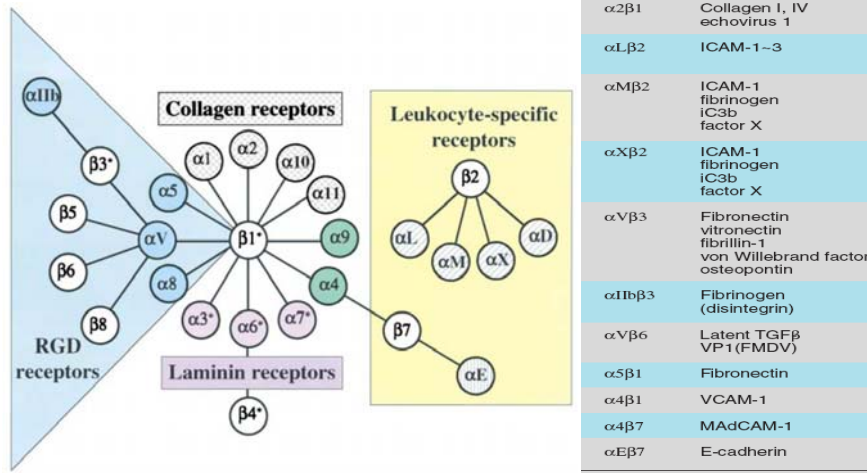


**Figure 20: Représentation schématique d'une intégrine.**

Les intégrines sont des complexes hétérodimériques avec une tête ("propeller/thigh" pour la sous-unité  $\alpha$  et " $\beta$ A/hybrid/PSI" pour la sous-unité  $\beta$ ) supportée par des pattes ("Calf1/2" pour la sous-unité  $\alpha$  et les domaines "EGF" et " $\beta$ -tail" pour la sous-unité  $\beta$ ). La liaison au ligand se situe entre les domaines "propeller" et " $\beta$ A". La tête et les pattes forment la région extracellulaire de l'intégrine. La région intracellulaire interagira avec le cytosquelette et les molécules associées.

Source: (Askari et al., 2009).

Bien qu'elles soient présentes dans les organismes métazoaire simples comme les éponges ou les coraux (Nichols et al., 2006), leur nombre et leur variété se sont largement agrandis au cours de l'évolution. Les intégrines sont formées d'une sous-unité  $\alpha$  et d'une sous-unité  $\beta$ . L'homme compte 18 sous-unités  $\alpha$  différentes et 8 sous-unités  $\beta$  différentes dans son génome, permettant 24 combinaisons  $\alpha/\beta$  (Hynes, 2002) (Figure 21).



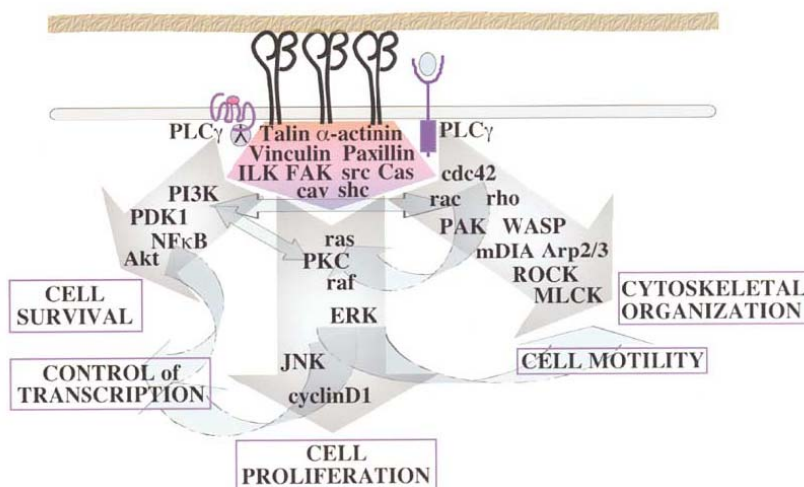
**Figure 21: La famille des intégrines et une partie de leurs ligands.**

Les mammifères présentent 18 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$ , formant 24 combinaisons d'hétérodimères possibles. Ces combinaisons ont une affinité préférentielle pour certains ligands de la MEC.

Source: (Hynes, 2002), (Takagi, 2007).

Ces multiples combinaisons permettent une grande diversité de reconnaissance de molécules de la MEC (Takagi, 2007). On peut notamment citer les intégrines spécialisées dans la reconnaissance des sites RGD (Arg-Gly-Asp) des protéines de la MEC, comme  $\alpha V\beta 3$ , reconnaissant entre autre l'ostéopontine et la fibronectine, ou encore  $\alpha 5\beta 1$  reconnaissant la fibronectine (Figure 21). La liaison de ces intégrines à des molécules solubles contenant la séquence RGD, comme la molécule GRGDSPK (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Lys), va ainsi empêcher l'interaction de la cellule avec la MEC (Hatakeyama et al., 2007).

Les intégrines peuvent transmettre un signal de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule, leur permettant de réguler leur adhésion, en modifiant les interactions intracellulaires entre les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  (Emsley et al., 2000; Takagi, 2007), amenant à un changement de conformation du site de fixation au ligand, ayant pour effet final l'activation des intégrines (Faull and Ginsberg, 1996): c'est la signalisation "inside-out". Elles peuvent aussi transmettre un signal de la MEC au cytoplasme, après regroupement ("cluster") et liaison à un ligand, contrôlant ainsi l'apoptose, l'expression spécifique de gènes, l'engagement dans le cycle cellulaire, la migration ou l'organisation du cytosquelette, par activation de certaines voies cellulaires, grâce aux multiples connections des intégrines avec d'autres constituants cellulaires (cf. B. Chapitre II-1.1.3.2. Les plaques d'adhésion) (Hynes, 2002): c'est la signalisation "outside-in" (Figure 22).



**Figure 22: Signalisation "outside-in" des intégrines grâce à des molécules partenaires**

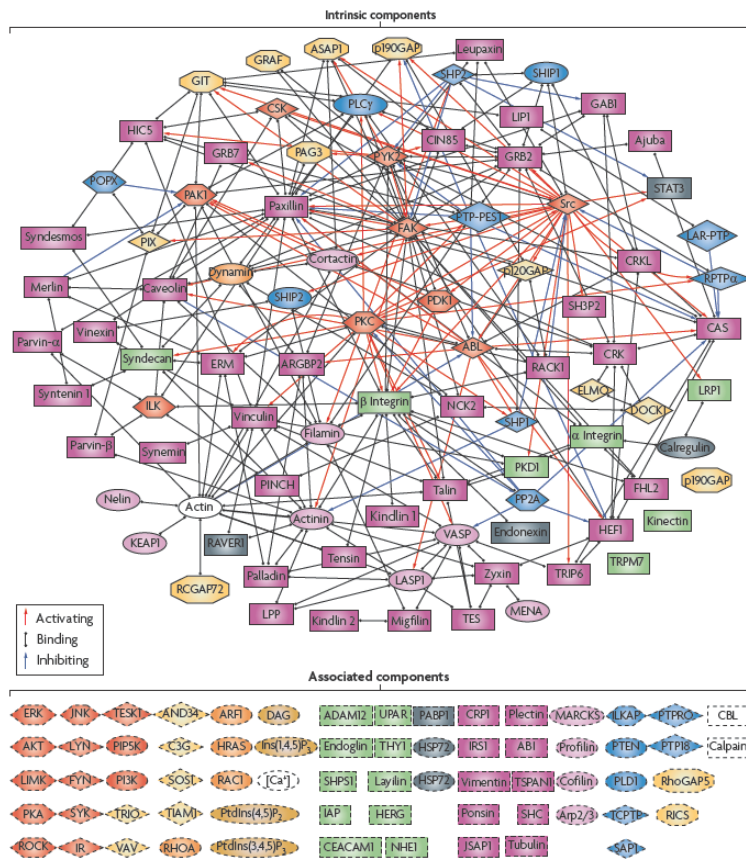
Les signaux majeurs de transduction du signal par la signalisation "outside-in" des intégrines sont représentés, amenant à des effets majeurs sur la biologie de la cellule. Les principales molécules de liaison entre les intégrines et les voies de transduction sont représentées dans le pentagone violet, situé sous le regroupement intégrinique.

Source: (Hynes, 2002)

Ainsi les intégrines ont de multiples rôles dans la transmission des informations vers et depuis l'environnement.

### 1.1.3.2. Les plaques d'adhésion

Les intégrines sont regroupées dans de larges complexes multiprotéiques reliant la MEC au cytosquelette, dénommés plaques d'adhésion. Des analyses moléculaires de ces sites d'adhésion ont dénombrées environ 160 composants différents, présentant de nombreuses interactions les uns envers les autres (Figure 23), laissant présager de nombreuses transductions de signaux à ce niveau.



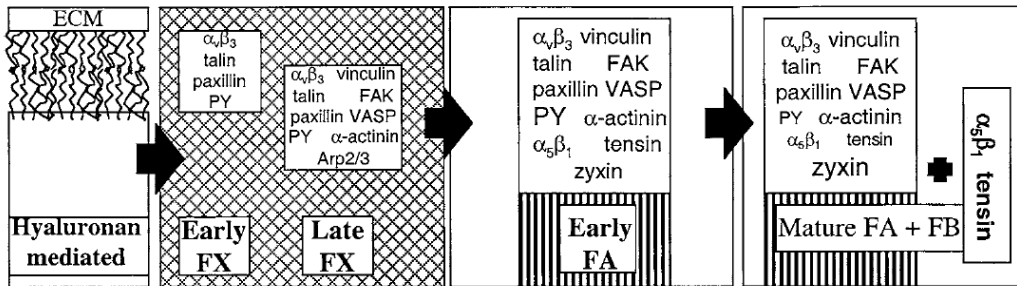
**Figure 23: Le réseau formé au sein des plaques d'adhésion.**

De nombreuses interactions se produisent (environ 700) au sein des plaques d'adhésion, avec des molécules activatrices, inhibitrices ou se liant à d'autres molécules. Dans ce schéma sont distinguées les molécules faisant constamment partie des plaques d'adhésion (encadrées) des molécules transitoires (encadrées en pointillés).  
Source: (Geiger et al., 2009)

Ces plaques ont été identifiées pour la première fois il y a une quarantaine d'années (Abercrombie et al., 1971). Certaines molécules du complexe multiprotéique permettent un

lien physique entre les intégrines et le cytosquelette et d'autre agissent comme molécules de transduction du signal (Yamada and Geiger, 1997), établissant les régulations inside-out et outside-in mentionnées plus haut (cf. B. Chapitre II-1.1.3.1. Les intégrines).

Plusieurs familles de plaques d'adhésion peuvent être discernées selon leur morphologie et leur composition, dictées par leur état de maturation: les complexes focaux (FX), les contact focaux ou adhésions focales (FA), les adhérences fibrillaires (FB) et les adhésions 3D (Figure 24) (Cukierman et al., 2001; Zaidel-Bar et al., 2004; Zamir et al., 1999).



**Figure 24: Evolution des plaques d'adhésion cellulaires**

Ce schéma montre l'évolution temporelle de formation et réorganisation des plaques d'adhésion, commençant par une adhésion médiée par les hyaluronanes jusqu'à l'évolution en complexes focaux (FX), adhésion focale (FA) et adhésion fibrillaire (FB) impliquant les intégrines. Chaque type d'adhésion comporte des composants caractéristiques.

Source: Zaidel-Bar et al., 2004

Les FX et les FA ont largement été décrits comme étant des mécano-senseurs, étant donné que leur morphologie se modifie en fonction des contraintes mécaniques reçues, qu'elles soient extra ou intracellulaire (Riveline et al., 2001), de part la participation, notamment, du complexe actine-myosine (Choi et al., 2008). Une des intégrines composant les FX/FA est  $\alpha v \beta 3$  (Zaidel-Bar et al., 2004). Dans ces complexes, on peut aussi citer la vinculine, protéine de liaison entre les intégrines et le cytosquelette, permettant de les identifier (Ziegler et al., 2006). Les FB permettent l'assemblage de la MEC, notamment de la fibronectine (Leiss et al., 2008), et une des intégrines caractéristiques est  $\alpha 5 \beta 1$  (Zaidel-Bar et al., 2004; Zamir et al., 1999). Les adhésions 3D, structurellement et morphologiquement différentes des FX, FA et FB (Figure 25), se forment lorsque les cellules sont cultivées dans un environnement tridimensionnel, et sont ainsi plus proches de ce qui peut se trouver *in vivo* (Cukierman et al., 2001).

Molécule	Focal adhesion	Fibrillar adhesion	3D-matrix adhesion
$\alpha_5$ integrin	—*	+	+
$\beta_1$ integrin	+	+	+
$\beta_3$ integrin	+	—	—
Fibronectin	—*	+	+
$\alpha$ -actinin	+	±	+
F-actin	+	+	+
Talin	+	+	+
Tensin	+	+	+
Vinculin	+	—	+
Phosphotyrosine	+	—	+
FAK	+	—	+
FAK <sup>397</sup>	+	—	—
Paxillin	+	—	+
Paxillin <sup>31</sup>	+	—	+

**Figure 25: Composition moléculaire des plaques d'adhésion.**

L'astérisque indique que les composants se trouvent uniquement en périphérie de la structure.

Source: adapté de (Cukierman et al., 2001).

Un parallèle structural peut être établi entre les différentes structures multiprotéiques d'adhérence des fibroblastes, des ostéoblastes, et les podosomes ostéoclastiques (Block et al., 2008) ainsi que les invadopodes des cellules invasives (Albiges-Rizo et al., 2009).

La localisation des plaques d'adhésion suggère leur rôle d' "ancrage", permettant de maintenir la forme de la cellule et sa position, de "pied", permettant la migration, et de "jauge" dans la réponse à l'environnement mécanique. La composante mécanique des FX/FA indique en effet que les cellules sont capables de sentir et transmettre les différentes tensions, et d'adapter la taille et la résistance de leurs structures d'adhérence en conséquence (Geiger et al., 2001; Ingber, 1991). Nous allons maintenant aborder deux modèles tentant d'expliquer la mécanique de la cellule face à son environnement.

#### 1.1.4. La tenségrité

Le concept de tenségrité est apparu dans les années 1960 et est dû à Richard Buckminster Fuller, architecte américain (Fuller, 1961). Cet état caractérise la faculté d'une structure à s'équilibrer par le jeu de forces de tension et de forces résistant à la compression. Le mot d'origine, "tensegrity", est formé de la contraction des mots "tensional" et "integrity", indiquant l'état final de tension isométrique, c'est-à-dire de "pré-tension" dans laquelle les forces en présence ne modifient pas la longueur des structures. Ainsi un système mécanique comportant un ensemble discontinu de composants comprimés au sein d'un continuum de

composants tendus, peut se trouver dans un état d'auto-équilibre stable, indépendamment de la gravité terrestre (à l'inverse des structures résistant seulement à la compression, comme les arches de pierre). Ceci signifie, par exemple, qu'en reliant des barres par des câbles, sans relier directement les barres entre elles, on arrive à constituer un système rigide, par support local d'un élément par un autre. Les premiers modèles de tensegrité ont été réalisés par un étudiant de Fuller, le sculpteur américain Kenneth Snelson (Figure 26).



**Figure 26: Sculpture de Kenneth Snelson: "Triple crown" (à gauche) et grossissement d'une sculpture (à droite).**

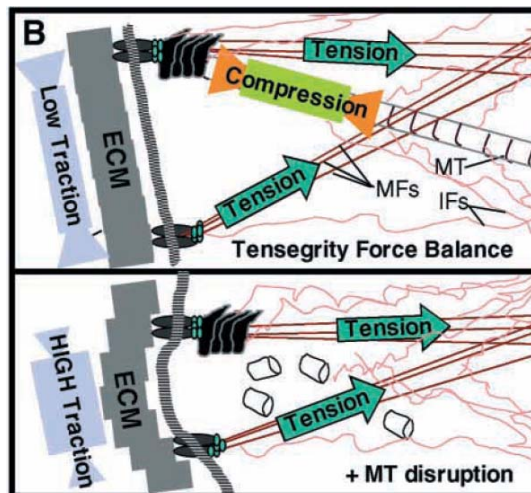
Les sculptures sont formées de câbles, générant des forces de tension équilibrées avec les forces de compression des barres d'acier.

Source: (Ingber, 2003a).

Il y a près d'un siècle, D'Arcy Wentworth Thompson (*On growth and form, 1917*), biologiste et mathématicien écossais, observant que les cellules souches se développaient à l'intérieur de structures complexes, émis l'hypothèse qu'il existait de nombreuses et complexes forces, latentes ou actives, dans une cellule. Une soixantaine d'années après cette réflexion, le cytosquelette (cf. B. Chapitre II-1.1.1. Le cytosquelette) des cellules eucaryotes était identifié en totalité avec la découverte des filaments intermédiaires (Ishikawa et al., 1968). Il a été montré dans ces années que toutes les cellules nucléées, et pas seulement les cellules musculaires, étaient équipées d'un cytosquelette. Cette nouvelle vue d'une cellule "câblée" fit alors penser il y a 40 ans à Donald E. Ingber, médecin et scientifique américain, que les cellules pourraient être des structures dotées d'une tensegrité, grâce aux forces générées par les composants de leur cytosquelette, rappelant ainsi les spéculations de D'Arcy Thompson. Selon la théorie d'Ingber, les microtubules agissent comme des structures non compressibles résistants aux tensions contractiles des filaments d'actine (Ingber, 2003a), propriétés mécaniques démontrées expérimentalement (Mizushima-Sugano et al., 1983). Les filaments intermédiaires permettent dans ce modèle la stabilisation des microtubules et des microfilaments (Brodland and Gordon, 1990; Goldman et al., 1996). Par ailleurs, la MEC forme un système externe résistant aux tensions contractiles (via les plaques d'adhésion), dans



le cas où les microtubules sont absents, permettant aux forces de traction de la cellule (générées par les microfilaments) de remodeler le support de culture (Stamenovic et al., 2002). Au final, le cytosquelette n'est plus considéré comme un amoncèlement de molécules avec leurs propriétés mécaniques propres, mais comme une architecture en harmonie, permettant à la cellule d'être en équilibre sur son support de culture (Figure 27). De même, la cellule n'est plus vue comme un ballon rempli de mélasse, mais plutôt comme une tente (la toile représentant la membrane), avec une armature (le cytosquelette) et des sardines (les intégrines) l'ancrant à son support.



**Figure 27: Le cytosquelette est un modèle de tenségrité.**

Cette représentation schématique montre l'équilibre existant entre les forces de tension des microfilaments d'actine (MFs), la résistance à la compression des microtubules (MTs) et la stabilisation des structures apportée par les filaments intermédiaires (IFs) (en haut). Dans le cas d'absence de microtubules (en bas), les forces résistantes à la compression sont assurées par la matrice extracellulaire (ECM), permettant le remodelage de celle-ci par les forces de traction de la cellule.

Source: (Ingber, 2003a).

L'expérimentation a confirmée qu'un large nombre de cellules utilisent la tenségrité pour stabiliser leur forme et la structure de leur cytosquelette (Ingber, 1993; Ingber, 2003a; Ingber, 2006), laissant entrevoir que la mécanique de la cellule pouvait influencer sur son comportement global, par modulation de son état d'équilibre (Ingber, 1993).

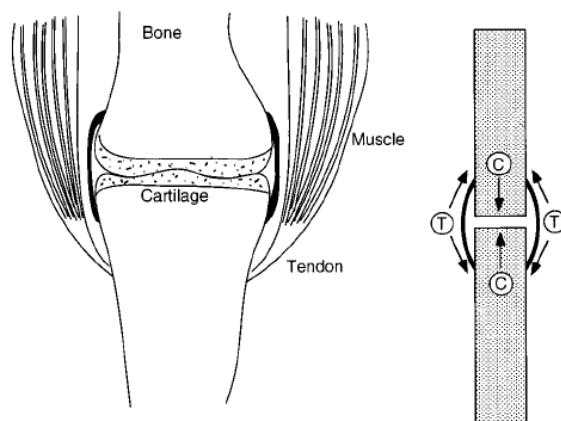
Une des principales caractéristiques découlant de la tenségrité est le maintien de la forme cellulaire. En effet, si l'équilibre des forces à l'intérieur de la cellule est altéré par des agents chimiques (Hubmayr et al., 1996; Wang et al., 2001), mécaniques (Kumar et al., 2006) ou en modifiant les propriétés mécaniques du support de culture (Pourati et al., 1998), il en résultera un changement de la forme cellulaire. La forme cellulaire (Huang and Ingber, 2000; McBeath



et al., 2004) et la qualité de la MEC (Engler et al., 2006) étant primordiales pour le devenir des cellules, la tenségrité cellulaire devient un concept important pour la compréhension du fonctionnement des organismes.

Contrairement, aux modèles établis de soutien de la charge mécanique au niveau de la zone corticale des cellules (Evans and Yeung, 1989; Schmid-Schonbein et al., 1995), dans lesquelles les forces sont transmises uniquement par des points de la surface cellulaire (cortex), le modèle de tenségrité prévoit que les contraintes mécaniques sont détectées par des réseaux moléculaires en pré-tension, pouvant se situer à n'importe quel point entre la surface cellulaire et l'intérieur du cytoplasme (Ingber, 2003a). Les molécules transmembranaires comme les intégrines se trouvent alors être des zones privilégiées du transfert de l'information mécanique (Wang et al., 1993). Un parallèle peut être ici établi avec les cordes d'une guitare. Elles forment également un système en "pré-tension", permettant la genèse d'un son (grâce à la caisse de résonance) au moindre pincement. Par analogie, il se conçoit que le cytosquelette, notamment les fibres de stress démontrées en état de "pré-tension" (Kumar et al., 2006), va offrir à la cellule un système optimal de détection de l'environnement mécanique, grâce notamment aux intégrines (Katsumi et al., 2005) qui leurs sont reliées (cf. B. Chapitre II-1.1.3.2. Les plaques d'adhésion). Cette capacité de mécano-traduction est un autre aspect important souligné par la tenségrité cellulaire (cf. B. Chapitre II-1.2. La mécano-traduction).

De manière intéressante, Richard B. Fuller avait noté que les systèmes en tenségrité peuvent être construits comme des systèmes hiérarchisés dans lesquels les éléments de tension et de compression situés à un niveau sont eux-mêmes composés de composants multiples en tenségrité, à une échelle inférieure (Fuller, 1961). Le noyau cellulaire peut ainsi être considéré comme une structure en tenségrité, avec la chromatine, formé d'ADN enroulé, représentant des éléments en compression, résistants aux forces de tension de la matrice cellulaire environnante (Ingber, 1993). La même remarque peut être établie à une échelle supérieure, au niveau des organismes (Ingber, 2003a; Ingber, 2006). En effet, dans le système musculo-squelettique, par exemple, les os sont en compression sous l'effet de la gravité terrestre et des forces de tension des muscles, des tendons et des ligaments (Chen and Ingber, 1999) (Figure 28). Ces structures hiérarchisées en tenségrité peuvent alors expliquer la transmission des informations mécaniques et la réponse coordonnée d'un organe à un stimulus, par couplage mécanique (Ingber, 2003a).



**Figure 28: Schéma de l'articulation du genou (à gauche) et sa simplification (à droite), montrant les forces en jeu dans l'os, les cartilages et les ligaments.**

Au niveau du cartilage, des forces de compression (C) apparaissent, générés par les forces gravitationnelles mais surtout par les forces de tension des ligaments, omniprésentes.

Source: (Chen and Ingber, 1999).

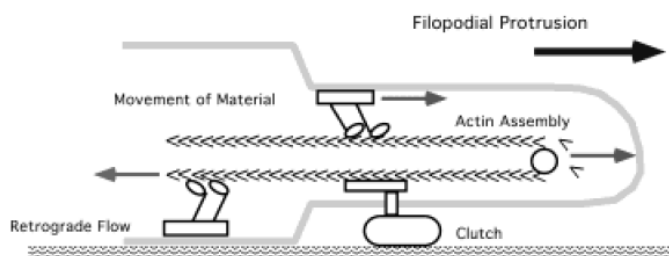
La vue classique de la biologie cellulaire est que le comportement de la cellule est régi par des facteurs solubles et des molécules d'adhésions insolubles, qui vont exercer leurs effets par liaison à des récepteurs de surface cellulaires, et ainsi activer diverses cascades de transduction du signal à l'intérieur de la cellule. Le modèle de la tenségrité inclut ces faits, mais intègre aussi un aspect mécanique dans lequel des modifications de l'équilibre cytosquelette-MEC, sous contrôle de récepteurs transmembranaires, vont pouvoir affecter le devenir des cellules (Ingber, 2003b). Ainsi, le terme de mécano-biologie prend toute son ampleur.

### 1.1.5. La théorie du "clutch" = théorie de l'embrayage

Cette théorie a été émise il y a 20 ans (Mitchison and Kirschner, 1988) pour rattacher la formation des protrusions cellulaires neuronales aux mécanismes contrôlant la dynamique de l'actine. La théorie fait notamment un parallèle imagé entre la cellule migrante, possédant donc des protrusions cellulaires (cf. B. Chapitre II-1.1.2. La migration cellulaire), et une voiture. Le flux d'actine, s'établissant en tapis roulant (Wang, 1985; Wegner, 1976), peut alors être comparé au moteur de la voiture, les plaques d'adhésion aux roues, et la MEC à la route.

Le moteur tourne d'abord "dans le vide", ce qui correspond à un grand flux rétrograde de l'actine (cf. B. Chapitre II-1.1.1.1. Les microfilaments), car il n'existe pas de connection aux sites d'adhésions. Ceci correspond à une situation où la pédale d'embrayage est appuyée. Lorsque le flux rétrograde d'actine est ralenti par interaction avec des plaques d'adhésion, via

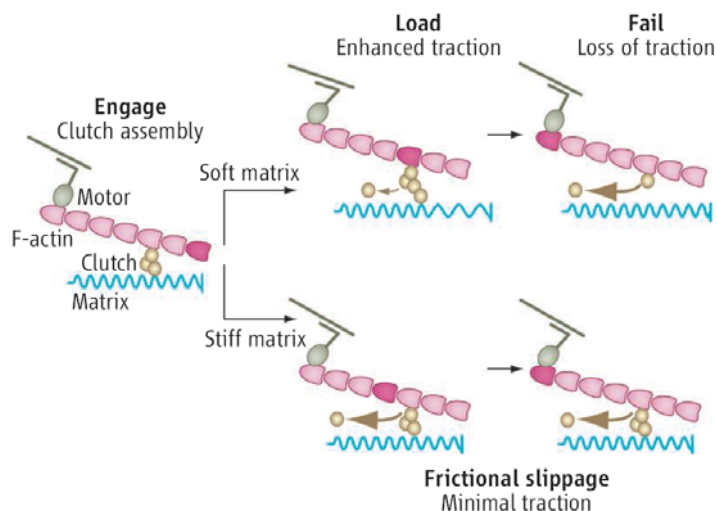
des protéines adaptatrices, formant ainsi un point d'attache, la polymérisation de l'actine en bout de pseudopode peut s'établir. Ceci correspond au relâchement de la pédale d'embrayage. La force générée est alors convertie en une traction sur le support de culture et une poussée de l'actine sur la membrane plasmique, formant une protrusion et permettant la formation de nouveaux sites d'adhésions (Figure 29). Une relation inverse a en effet été observée entre la vitesse du flux rétrograde de l'actine et la présence de protrusions membranaires (Jurado et al., 2005; Medeiros et al., 2006), ces extensions cytoplasmiques se situant aux sites d'adhésions nouvellement formés (Alexandrova et al., 2008; Giannone et al., 2007).



**Figure 29: L'hypothèse du "clutch".**

Les sites d'adhésions forment une résistance au flux rétrograde de l'actine (la myosine est aussi représentée), permettant la naissance de protrusions cellulaires.  
Source: (Jay, 2000).

La rupture du lien entre les plaques d'adhésion et l'actine peut aussi expliquer les cycles de rétraction des protrusions observés lors de la migration (Giannone et al., 2007). Ce lien permet, comme évoqué précédemment, la traction du support de culture, entraînant le remodelage de la MEC. Si la MEC est rigide, non remodelable, le flux rétrograde d'actine sera engagé dans le "clutch", mais rapidement désengagé, du fait que la matrice ne soit pas compliant. Dans ces conditions, le flux rétrograde d'actine restera rapide (forte tension) et seules de faibles forces de traction sur la matrice apparaîtront, ce qui constitue le modèle de "frictional slippage" ou "patinage de friction" de l'embrayage. A l'inverse, si la MEC est remodelable, le flux rétrograde d'actine, générant alors de faibles tensions, sera ralenti fermement, et les forces de traction sur la matrice seront élevées, jusqu'à ce que la tension ne soit plus supportée par le "clutch", ce qui constitue le modèle de "load and fail" ou charge et décharge de l'embrayage (Aratyn-Schaus and Gardel, 2008; Chan and Odde, 2008) (Figure 30).



**Figure 30: "Clutch" et remodelage de la matrice.**

L'actine (F-actin) est en relation avec la MEC au travers d'un "clutch" moléculaire. Les forces de tension générées au sein de l'actine par des protéines motrices comme la myosine sont transmises au "clutch" et à la MEC. Sur une matrice molle, remodelable, la faible tension générée dans le "clutch" maintient un taux de dissociation lent de ces constituants (flèche marron fine) et de fortes tractions du support (étirement de la ligne bleue en vague, "load"). A une tension critique, le "clutch" ne peut plus supporter les forces et se rompt ("fail"), résultant en une diminution du flux d'actine (chevron rose foncé à gauche) et de la traction de la MEC. Sur une matrice rigide, non remodelable, les forces de tension se forment rapidement, résultant en une dissociation augmentée des constituants du clutch (flèche marron épaisse), une force de traction minimale et une progression incessante du flux d'actine ("frictional slippage")

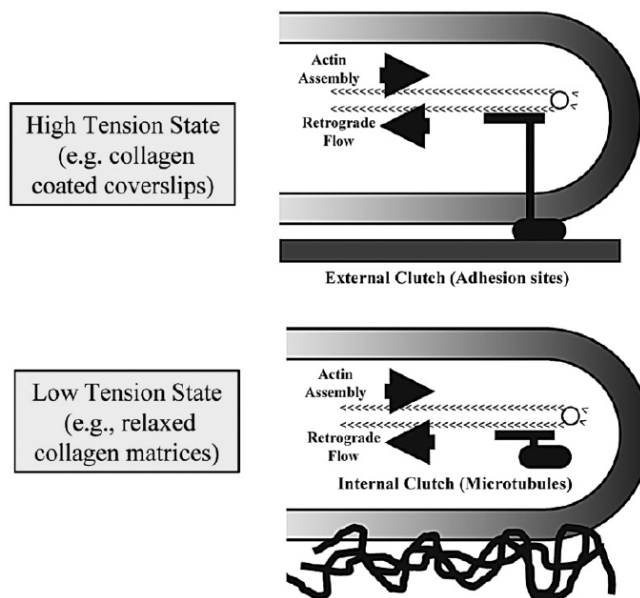
Source: (Aratyn-Schaus and Gardel, 2008).

De plus, la maturation des complexes adhésifs (cf. B. Chapitre II-1.1.3.2. Les plaques d'adhésion) peut être vue dans ce modèle comme le passage à une vitesse supérieure, puisque de plus en plus de forces vont pouvoir être appliquées au support de culture, et ainsi bloquer encore plus efficacement le flux rétrograde d'actine (Giannone et al., 2009).

Il est à noter que la nature du point d'attache permettant le ralentissement du flux rétrograde de l'actine (par engagement de l'embrayage/pédale relâchée) sera différente en fonction de l'état des interactions cellule-support de culture (Figure 31). A un haut niveau de tension (fibres de stress), comme lors de la culture sur des boîtes de Pétri, l'embrayage sera externe, c'est-à-dire que la protrusion membranaire sera définie par un mécanisme de ralentissement du flux rétrograde de l'actine par les plaques d'adhésion, comme décrit précédemment. A un faible niveau de tension (absence de fibres de stress), comme lors de la culture dans un gel de collagène (plus généralement en culture tridimensionnelle) ou lorsque la tension cellulaire est inhibée par de la blebbistatine (inhibiteur de la myosine), les protrusions deviennent alors largement dépendantes de la présence des microtubules. Dans ces conditions, le flux rétrograde de l'actine sera ainsi ralenti par les microtubules, représentant un embrayage

interne (Rhee et al., 2007), permettant la polymérisation de l'actine et générant au final des protrusions, par activation de molécules comme Rac1 (Waterman-Storer et al., 1999).

Ces différences dans le mécanisme du "clutch" peuvent expliquer pourquoi les protrusions sont lamellipodiales sur des boîtes de Pétri ou des lamelles de verre (regroupement d'intégrines en guise d'embrayage, donc protrusion globale), et filopodiales voire dendritiques dans des matrices de collagène (microtubules discrets pour embrayage, donc protrusion locale) (Rhee et al., 2007).



**Figure 31: Le "clutch" selon l'état matriciel.**

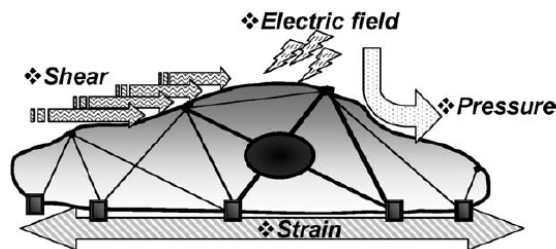
A un haut niveau de tension matricielle, le "clutch" est externe et est représenté par les plaques d'adhésion alors qu'à un faible niveau de tension matricielle, le clutch est interne et représenté par les microtubules.

Source: (Rhee and Grinnell, 2007).

La tenségrité prévoit que les forces de compression des microtubules s'équilibrent avec les forces de tension des filaments d'actine. Or, si on bloque la tension de cellules cultivées en gel de collagène par de la blebbistatine (inhibiteur de myosine), les protrusions ne deviennent pas moins dépendantes des microtubules, au contraire (Rhee et al., 2007), montrant qu'aucun équilibre ne se produit. Le modèle du "clutch" de la mécanique cellulaire complète ainsi le modèle de la tenségrité.

## 1.2. La mécano-traduction

Les cellules eucaryotes sont, pour bon nombre, capables de percevoir les modifications de leur environnement mécanique, et d'y répondre de façon appropriée: c'est la mécano-traduction. En effet, les cellules endothéliales (Wung et al., 1999), les myocytes cardiaques (Li et al., 1999), les cellules du rein (Ingram et al., 1999) ou des poumons (Kulik and Alvarado, 1993), pour citer quelques organes, sont capables de répondre à leur environnement mécanique. Il existe aussi des cellules spécialisées dans la réceptions des signaux mécaniques, comme les cellules ciliés de l'oreille interne (Corey et al., 2004). Cette aptitude des cellules d'organismes complexes est le fruit d'une conservation de l'évolution face aux nombreuses contraintes physiques environnementales, étant donné que les organismes plus simples, formés d'une seule cellule, comme *Escherichia Coli*, ont déjà cette capacité (Sukharev et al., 1997). Les cellules osseuses sont elles aussi capables de répondre aux modifications de leur environnement mécanique, permettant l'adaptation de l'os à la contrainte mécanique, connue depuis plus de 100 ans (Wolff, 1892). Dans leur micro-environnement, les cellules osseuses sont en effet soumises à différents stress mécaniques (Rubin et al., 2006) (Figure 32), les forces exercées sur le squelette lors des activités journalières générant des déformations de la surface de la MEC (étirement), des modifications dans la pression à l'intérieur de la moelle osseuse, des modifications dans les forces de cisaillement liquidiennes ou encore dans les champs électriques (potentiels de flux ou "streaming potentials" se formant lorsque qu'un flux liquidien est forcé à traverser un capillaire, ou piézo-électricité, reflétant la génération d'un signal électrique suite à la déformation de cristaux) lorsque les fluides rencontrent les minéraux osseux.



**Figure 32: Les contraintes mécaniques reçues par la cellule osseuse dans son micro-environnement.**

Les contraintes sur le squelette vont générer des déformations des tissus durs atteignant la surface où se trouvent les cellules osseuses (strain), mais aussi des modifications dans la pression de la cavité intramédullaire (pressure), des changements dans les forces de cisaillement liquidiennes (shear stress), notamment au niveau des canalicules ostéocytaires ou des altérations des champs électriques lorsque les fluides rencontrent les cristaux d'apatite (electric fields/streaming potentials, piézo-électricité).

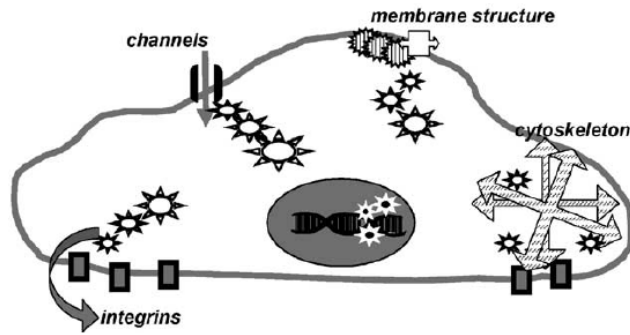
Source: (Rubin et al., 2006)

Il est cependant difficile de discriminer les effets de telle ou telle autre caractéristique physique *in vivo* (et même *in vitro*), la cellule recevant toutes ces stimulations après qu'un signal mécanique ait été appliqué au tissu osseux. Quoiqu'il en soit, cette "cacophonie physique" est perçue au niveau cellulaire par plusieurs structures, permettant au final une réponse intégrée de la cellule. Différents candidats ont en effet été proposés à la réception des signaux mécaniques environnementaux. Un point commun à ces différentes structures est leur lien entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, condition nécessaire au transfert de l'information environnementale (Figure 33).

Les premiers "mécano-senseurs" décrits furent les canaux ioniques (Guharay and Sachs, 1984), dont l'activité est stimulée par des contraintes d'étirement (Duncan and Hruska, 1994) ou de cisaillement (Ryder and Duncan, 2001) chez les ostéoblastes. Un autre type de canaux, les connexines, sont des protéines membranaires permettant des échanges entre deux cellules adjacentes au sein des jonctions communicantes ("gap junctions"). Il a été suggéré (Donahue, 2000) et démontré (Jekir and Donahue, 2009) que ces jonctions permettent la transmission de l'information mécanique à des cellules éloignées de la source d'information. En plus d'être impliquées dans les connexions intercellulaires, les connexines sont aussi des liens entre la cellule et son environnement extracellulaire. Ces canaux, appelés héli-canaux sont aussi impliqués dans la réception des signaux mécaniques (Siller-Jackson et al., 2008).

La couche de protéoglycane (glycocalyx) est la première structure de la cellule en contact avec l'environnement extérieur qui peut transmettre les forces à la membrane plasmique (Tarbell et al., 2005). La membrane cellulaire est elle formée d'une bicouche phospholipidique incluant les cavéoles. Ces structures ont aussi été montrées comme des éléments critiques de l'intégration des informations mécaniques à la surface cellulaire (Anderson, 1998). Leur importance dans la mécano-traduction vient de leurs associations multiples avec des éléments discrets de signalisation (GTPases, kinases, calcium). Le désassemblage des cavéoles inhibe en effet la transduction du signal mécanique (Rizzo et al., 1998).

Enfin, le candidat par excellence pouvant transmettre à l'intérieur de la cellule les événements mécaniques externes sont les intégrines, et plus globalement les plaques d'adhésion (Katsumi et al., 2004) (cf. B. Chapitre II-1.1.3.2. Les plaques d'adhésion). Les intégrines sont en effet des mécanorécepteurs dans de nombreux types cellulaires comme les myocytes (Aikawa et al., 2002), les fibroblastes (Tadokoro et al., 2003), les cellules endothéliales (Shyy and Chien, 2002), les chondrocytes (Millward-Sadler and Salter, 2004) et les cellules osseuses (Salter et al., 1997).

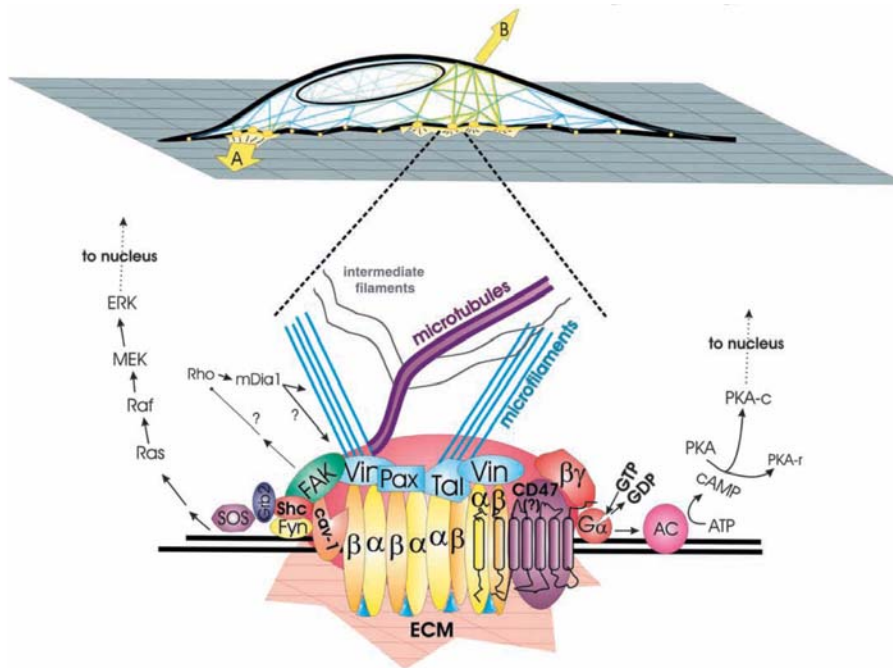


**Figure 33: Les mécano-senseurs cellulaires.**

Plusieurs structures peuvent percevoir l'environnement mécanique, comme les canaux ioniques, certaines structures membranaires, les intégrines et le cytosquelette, au sein des plaques d'adhésion. Ces structures sont capables d'activer des voies de transduction intracellulaires.

Source: (Rubin et al., 2006)

Cette capacité leur vient de leurs interactions avec de nombreuses molécules intracytoplasmiques et leur lien avec le cytosquelette (Figure 34), leur permettant de transmettre efficacement les signaux mécaniques (Liu et al., 2000).



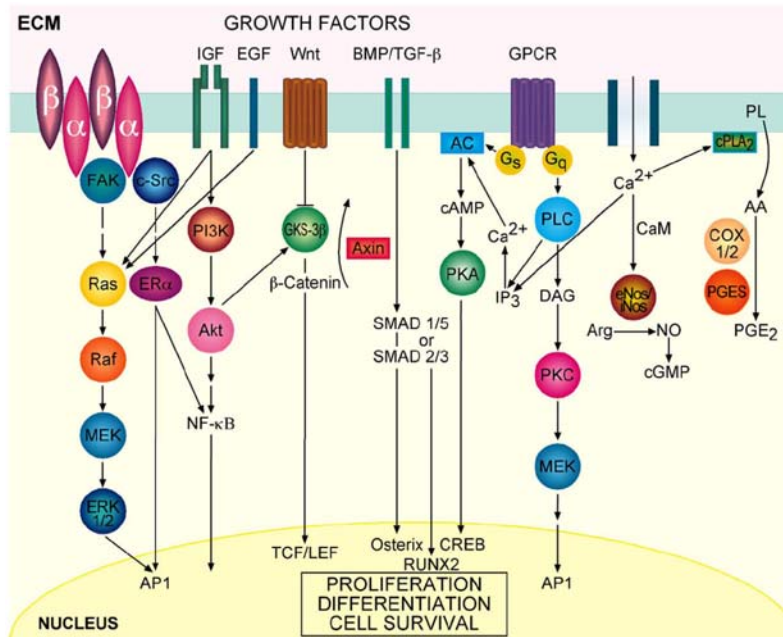
**Figure 34: Transmission des forces de la MEC aux molécules de signalisation à l'intérieur de la cellule.**

Les forces mécaniques appliquées à la MEC (A) ou directement à la surface cellulaire (B) sont transmises au cytosquelette par les intégrines à l'intérieur des plaques d'adhésion. S'ensuivra une cascade de signalisation, permettant au final la réponse de la cellule par intégration des signaux au niveau du noyau.

Source: (Ingber, 2003b).



Avec la diversité des signaux mécaniques, il est évident que la réception et la transmission des stimuli n'est pas l'apanage d'un seul type de récepteur. Ces récepteurs interagissent probablement les uns avec les autres afin d'établir une transmission intégrée de l'information, donnant lieu à de nombreuses voies de signalisation biochimiques (Figure 35). Ainsi, la cellule fournira une réponse appropriée au signal reçu, en termes de prolifération, différenciation ou survie, grâce notamment à la sécrétion de facteurs de croissance.



**Figure 35: Les voies de mécano-transduction des cellules ostéoblastiques.**

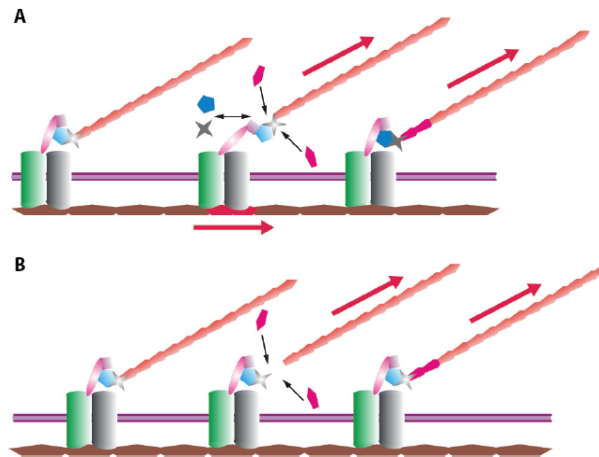
Ce schéma montre les multiples voies pouvant être sollicitées lors d'un stress mécanique, aboutissant à une réponse cellulaire intégrée.

Source: (Liedert et al., 2006).

Le modèle de tenségrité de la mécanique cellulaire (cf. B. Chapitre II-1.1.4. La tenségrité) est en parfait accord avec une transmission de l'information mécanique jusqu'au cytosquelette, grâce au préstress continuellement présent au sein de la structure cellulaire. Ainsi quelque soit la nature du signal mécanique (étirement, stress de cisaillement, pression...), la tenségrité permet le transfert des forces d'un point à un autre de la cellule. Ensuite, une enzyme donnée peut, par exemple, changer de conformation par ce transfert d'énergie mécanique, et finalement modifier son taux de conversion d'un substrat en produit (Ingber, 2003b).

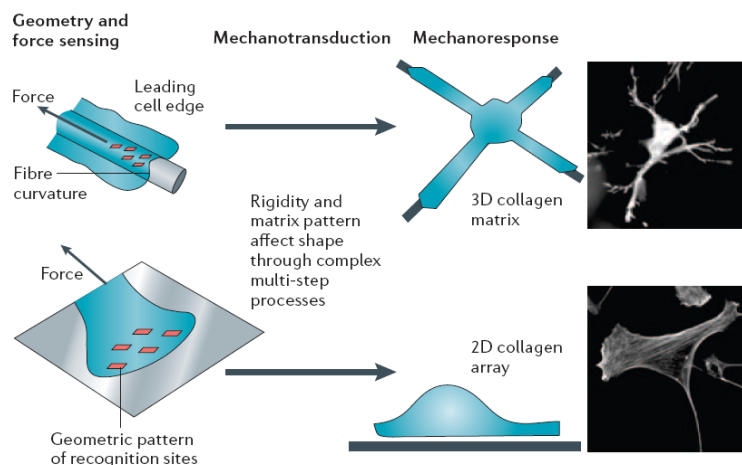
Le modèle du "clutch" (cf. B. Chapitre II-1.1.5. La théorie du "clutch" = théorie de l'embrayage) a lui aussi été montré comme pouvant être impliqué dans la traduction de

l'information mécanique (Chan and Odde, 2008), les intégrines étant en contact avec les micro-filaments, puisque ralentissant le flux rétrograde d'actine. Si l'embrayage est intermittent dû à un mauvais renouvellement des molécules faisant le lien entre les plaques d'adhésions et le flux d'actine, l'embrayage patinera ("slippage clutch") et l'information mécanique sera moins bien transmise (Wang, 2007) (Figure 36).



**Figure 36: Les adhésions focales engagées dans un "clutch" permettent la transmission de l'information.** (A) Lorsque les molécules établissant le lien entre les plaques d'adhésion et le flux d'actine (fibre orange) sont renouvelées constamment (pentagone bleu foncé et étoile noire remplaçant le pentagone bleu ciel et l'étoile grise), l'embrayage est engagé (pédale relâchée) et le transfert de la tension est effectuée avec la polymérisation de l'actine monomérique (rose). (B) En revanche, si ce renouvellement n'est plus effectif (pentagone bleu ciel et étoile grise tout au long du temps, de gauche à droite), le transfert des informations mécaniques sera de moins bonne qualité dû au désengagement de l'embrayage (pédale enfoncée de temps en temps), occasionnant un patinage de l'embrayage ("slippage clutch").  
Source: (Wang, 2007).

La mécano-traduction du signal mécanique sous-tend aussi l'intégration des voies de transduction au niveau morphologique (Figure 37). En effet, des différences morphologiques drastiques peuvent être observées entre des fibroblastes cultivés dans des matrices collagéniques, qui émettent un réseau dendritique de protrusions cytoplasmiques, et des fibroblastes cultivés sur des lames recouvertes de collagène (Grinnell et al., 2003).



**Figure 37; De l'appréhension de la surface à la réponse cellulaire.**

La cellule va d'abord "sentir" son environnement, mécanique, ici sa surface de culture, puis transmettre le message reçu avant d'établir une réponse appropriée. Ici est montré l'exemple des différences morphologiques engendrées par différents supports sur des fibroblastes humains, après 4 heures de culture.

Source: (Vogel and Sheetz, 2006).

Ainsi, la mécano-traduction osseuse, c'est-à-dire la traduction d'une information physique en information biologique, bien qu'encore mal comprise, se décompose en quatre étapes (Duncan and Turner, 1995):

- 1) Le couplage mécanique, dans lequel la force mécanique appliqué à l'os est transformée en un signal mécanique local, perçu par une (ou des) cellule(s) cible(s).
- 2) Le couplage biochimique, dans lequel le signal mécanique local est converti en signal biochimique et finalement en activations protéiques multiples.
- 3) La propagation du signal, effectuée au sein d'une population cellulaire mais aussi des cellules cibles aux cellules effectrices, c'est-à-dire celles qui vont avoir une action concrète sur le tissu osseux.
- 4) La réponse des cellules effectrices, qui sera appropriée au signal mécanique initial perçu.

Nous allons maintenant voir quels signaux biologiques caractéristiques les cellules osseuses (notamment les ostéoblastes) émettront en réponse à une stimulation mécanique.

### **1.3. Les marqueurs de mécano-sensibilité**

Les marqueurs de mécano-sensibilité sont des molécules dont la production est modulée par les signaux mécaniques, à une étape de la mécano-traduction. Après un stress mécanique et lors de la transduction du signal, l'oxyde nitrique (NO) et les prostaglandines (PGs) sont des

molécules de signalisation rapidement secrétées (Ajubi et al., 1999; Bacabac et al., 2004), leur suppression empêchant la réponse à la contrainte (Chow and Chambers, 1994; Turner et al., 1996). Nous allons aussi voir dans cette section que certaines protéines de la MEC voient leur expression/production augmentée sous stress mécanique (Vascular Endothelial Growth Factor, Ostéopontine, Fibronectine, Collagène).

Le NO, un radical libre hautement réactif, a de nombreuses implications biologiques (système cardiovasculaire, immunitaire, nerveux, tractus gastrointestinal et axe gonadique). Il est généré à partir de la L-arginine par les "Nitric Oxide Synthases" (NOS I=nNOS ou NOS neuronale, NOSII=iNOS ou NOS inductible et NOSIII=eNOS ou NOS endothéliale (Schmidt et al., 1992)), enzymes ubiquitairement distribuées dans l'organisme et notamment présentent dans l'os et les cellules osseuses (Fox and Chow, 1998; Helfrich et al., 1997). Les effets du NO peuvent passer par l'activation de la guanylate cyclase (par association à sa partie hémique), augmentant ainsi la production du second messenger GMP cyclique (Gross and Wolin, 1995) et l'activation de protéines kinases dépendante du GMPc (par exemple PKG) ou passer par la nitrosylation, modifiant les interactions entre protéines (Matsumoto et al., 2003). Le NO a un effet biphasique sur les cellules osseuses; capable d'augmenter la prolifération et l'activité de la phosphatase alcaline des ostéoblastes (Mancini et al., 2000) et de permettre la résorption ostéoclastique (Brandi et al., 1995) à faibles concentrations (concentrations physiologiques), il est cytotoxique à fortes concentrations (concentrations pathologiques) pour les cellules ostéoformatrices (Mancini et al., 2000) et les précurseurs ostéoclastiques (van't Hof and Ralston, 1997), inhibant ainsi la résorption (Kasten et al., 1994; MacIntyre et al., 1991). Depuis le début des années 1990, un rôle en tant que modulateur de la réponse des cellules osseuses aux stimuli mécaniques lui a été attribué (Pitsillides et al., 1995). Il a été montré en effet qu'il était impliqué *in vivo* et *in vitro* dans la transduction du signal mécanique. L'une des premières études à ce sujet a révélé que l'inhibition des NOS *in vivo* inhibait la réponse de formation osseuse induite par la contrainte mécanique *in vivo* (Turner et al., 1996). Le NO agit en fait comme médiateur précoce de la formation osseuse en réponse à la contrainte mécanique (Fox et al., 1996), suggérant l'implication des nNOS et eNOS, constitutivement présentes (eNOS et nNOS forment le groupe cNOS).

Les acides gras insaturés sont transformés par une série d'étapes en acide arachidonique et en acide écosapentaénoïque, précurseurs des prostaglandines (PGs). La prostaglandine E2 (PGE2) est largement présente dans l'os (Norrdin et al., 1990). Deux isoenzymes, COX1

(CycloOxygénase constitutive) et COX2 (CycloOxygénase inductible), sont associées aux PGE2 synthétases afin de réguler la synthèse de la PGE2. La PGE2 agit par fixation à ses récepteurs couplés aux protéines G (EP1-4), affectant la production de seconds messagers (calcium, AMPc). Les PGs ont des effets inhibiteurs, mais aussi activateurs sur les ostéoblastes (Fall et al., 1994; Woodiel et al., 1996) et les ostéoclastes (Lader and Flanagan, 1998; Quinn et al., 1997). Cette diversité de fonctions est probablement le résultat de voies de transductions différentes des récepteurs aux PGs (Raisz, 1999). La production de PGs augmente après stimulation mécanique *in vivo* (Thorsen et al., 1996) et *in vitro* (Bakker et al., 2003; Mitsui et al., 2005; Nauman et al., 2001).

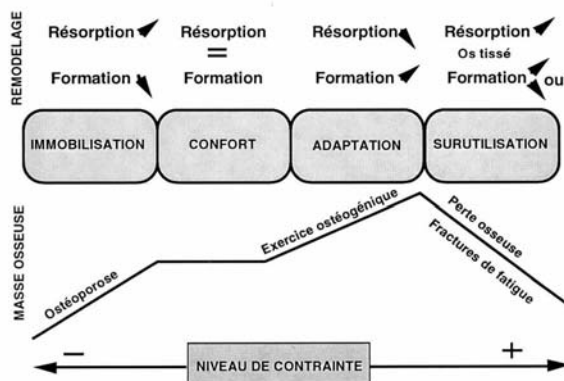
Le VEGF ou VEGF-A (Vasular Endothelial Growth Factor), est une cytokine angiogénique sécrétée par les ostéoblastes en réponse à une modification mécanique de leur environnement (Thi et al., 2007). L'expression des ARNm et des protéines du VEGF-A augmente en effet sous stimulation mécanique chez l'ostéoblaste (Dumas et al., 2009; Thi et al., 2007), avec une préférence d'isoforme, donnant lieu à des protéines solubles ou matricielles (Ferrara et al., 2003), suivant la qualité de la stimulation (Faure et al., 2008). Le VEGF a en fait un effet global sur le métabolisme osseux (Gerber et al., 1999; Harada et al., 1995) et la vascularisation (Tombran-Tink and Barnstable, 2004), et est ainsi important dans le développement et la réparation osseuse (Towler, 2008). Il a d'ailleurs été montré que suite à un exercice physique chez le rat, l'expression du VEGF et de son récepteur VEGF-R1 augmentait, permettant l'accroissement de la masse et de la vascularisation osseuse (Yao et al., 2004). Le VEGF-A se lie à ses récepteurs VEGF-R1 (flt-1) ou VEGFR-2 (KDR) afin d'établir ses effets (Ferrara et al., 2003). Ils sont exprimés par les ostéoblastes (Deckers et al., 2000) et les ostéoclastes (Aldridge et al., 2005). Le VEGF-A stimule par ailleurs la migration ostéoblastique (Midy and Plouet, 1994), est anti-apoptotique pour ces cellules (Street, 2006) et augmente la survie et l'activité de résorption ostéoclastique (Nakagawa et al., 2000; Niida et al., 1999; Yang et al., 2008).

Enfin, les stimulations mécaniques sont capables d'induire chez les ostéoblastes la synthèse de certaines molécules de la MEC. Nous pouvons citer parmi les protéines caractéristiques de la réponse à la contrainte mécanique l'ostéopontine (Kubota et al., 1993; Morinobu et al., 2003; You et al., 2001a) dont l'expression est dépendante de la présence de microfilaments (Carvalho et al., 2002; Toma et al., 1997), la fibronectine (Carvalho et al., 2002; Dumas et al., 2009; Faure et al., 2008), la sialoprotéine osseuse (BSP) (Carvalho et al., 2002; Kesavan et

al., 2005; Mitsui et al., 2005) ou encore le collagène de type I (Harter et al., 1995; Kaspar et al., 2000a), dont l'augmentation d'expression liée à la contrainte mécanique dépendra du stade de différenciation (Roelofsen et al., 1995). De plus, l'expression de la phosphatase alcaline, enzyme sécrété par les ostéoblastes permettant la minéralisation de la MEC, grâce à l'hydrolyse des liaisons organophosphate, augmente également sous stimulation mécanique (Kesavan et al., 2005; Roelofsen et al., 1995).

#### **1.4. Le mécanostat**

Les capacités de perception, d'analyse et de réponse à l'environnement mécanique par les cellules osseuses permettent au final l'adaptation du tissu osseux à la contrainte mécanique (Frost, 1964). De nombreuses données illustrent en effet les capacités d'adaptation osseuse aux contraintes mécaniques, avec des travaux effectués chez l'animal comme chez l'homme, montrant un gain de masse osseuse (régimes ostéogéniques) après certains entraînements physiques (dans lesquels le squelette reçoit une charge) (Karinkanta et al., 2009; Umemura et al., 2008; Zouch et al., 2008) et une perte de masse osseuse après immobilisation à long terme (alitement prolongé) (Spector et al., 2009; Thomsen et al., 2005) ou exposition à la microgravité (Vico et al., 2000). Il est à noter que le gain osseux ne se produit que dans des conditions où le signal est dynamique (cyclique), les signaux statiques n'entraînant pas de réponse tissulaire (Akyuz et al., 2006; Lanyon, 1992; Lanyon and Rubin, 1984), et ceci uniquement jusqu'à un certain niveau, au-delà duquel des effets délétères, comme les fractures de fatigue, surviennent (Verheyen et al., 2006). Cette capacité d'adaptation de l'os a été dénommée "mécanostat" par Harold Frost (Frost, 1987). Ce mécanostat est divisé en plusieurs fenêtres d'adaptation, fonction des niveaux de contraintes reçues par le tissu osseux (Figure 38).

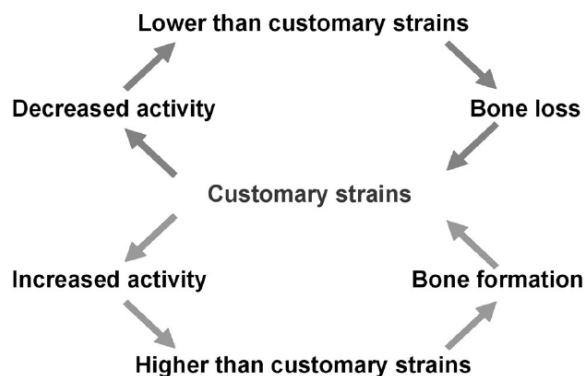


**Figure 38; Le mécanostat.**

Les changements d'activité des cellules osseuses, suivant le niveau de contrainte, mènent à différents profils de réponses au niveau tissulaire, avec les bas niveaux de contraintes causant une perte osseuse (ostéoporose par immobilisation) et les hauts niveaux de contraintes permettant un gain osseux (adaptation), jusqu'à un seuil au-delà duquel des fractures surviennent (surutilisation). Il existe aussi une fenêtre de contrainte dans laquelle le tissu osseux est à l'équilibre (confort), l'activité de résorption osseuse étant au même niveau que l'activité de formation osseuse.

Source: (Lafage-Proust et al., 1999).

Si la surutilisation et l'immobilisation sont définies comme une augmentation et une diminution des contraintes auxquelles le tissu osseux est habitué (ou adapté), il ne peut exister de fenêtres bornées pour l'ensemble des individus. En effet, un haltérophile compétiteur aura une masse osseuse plus importante qu'un individu témoin ne faisant pas de compétition sportive (Suominen, 2006). Dans son cas, un arrêt de ses activités de compétition, tout en continuant son sport par plaisir, entraînera une perte osseuse, même si les contraintes que son squelette subi sont supérieures à celles d'un individu lambda (Karlsson et al., 1995). A l'inverse, si la personne lambda effectue les activités de l'haltérophile retiré de la compétition, il ne subira pas de perte osseuse mais plutôt un gain. Les régulations régies par le mécanostat surviennent en fait lorsque le squelette est soumis à des activités inhabituelles (Skerry, 2008), afin de résister à la fracture dans le cas d'une augmentation du stress mécanique subi par l'os, ou alors afin d'économiser de l'énergie dans le cas d'une diminution de ce stress mécanique. Ainsi, différents individus et différents sites osseux n'auront pas le même mécanostat, ce dernier dépendant des activités habituelles de l'organisme (Skerry, 2006) ou du site osseux (Alwis et al., 2008; Kannus et al., 1995) considéré, de l'âge (Jarvinen et al., 2003), du sexe (Martin, 2002) ou encore des facteurs circulants individuels (Chow et al., 1998). C'est par un mécanisme de rétrocontrôle permanent que le mécanostat permet d'ajuster la masse et l'architecture osseuse d'un individu (Figure 39:).



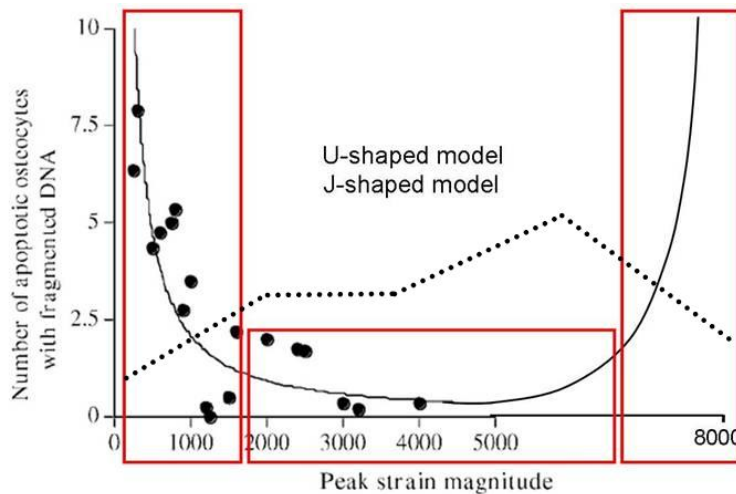
**Figure 39: Ajustement de la masse et de l'architecture osseuse par les contraintes mécaniques.**

La diminution des contraintes qu'un sujet perçoit par rapport à leurs niveaux habituels entraînera une perte de masse/architecture osseuse alors qu'une augmentation des contraintes par rapport à ce niveau de base entraînera un gain de masse/architecture osseuse.

Source: (Skerry, 2006).

De façon intéressante, nous pouvons établir un parallèle entre le mécanostat et l'apoptose des ostéocytes, cellules osseuses suspectées comme étant des récepteurs spécialisés des signaux mécaniques (Burger and Klein-Nulend, 1999) (Figure 40). En effet, le groupe de l'éco-sais Brendon Noble a décrit, en établissant une "carte de contraintes" de l'os cortical, que les ostéocytes apoptotiques se situent aux faibles et hauts niveaux de contraintes (Noble et al., 2003), niveaux induisant une perte osseuse selon le mécanostat. Cette équipe a démontré par ailleurs que les corps apoptotiques des ostéocytes enclenchent le remodelage osseux en activant la résorption ostéoclastique (Kogianni et al., 2008); une autre équipe a pu mettre en évidence que la fatigue osseuse (liée à une surutilisation) induisait une apoptose ostéocytaire contrôlant la résorption intracorticale (Cardoso et al., 2008). Ces deux derniers éléments sont ainsi en accord avec le mécanostat. Il a aussi été démontré que les contraintes mécaniques intermédiaires diminuaient *in vivo* la production de SOST, le gène codant pour la sclérostine (Poole et al., 2005), une protéine ostéocytaire inhibant la formation osseuse et permettant ainsi le maintien ou l'adaptation de l'os à la contrainte mécanique (Robling et al., 2008) (on peut penser que l'effet ostéogénique de la contrainte mécanique dans la partie haute de la zone intermédiaire de contrainte peut venir d'un effet direct du signal mécanique sur la production matricielle des ostéoblastes).





**Figure 40: Relations entre le niveau de contrainte et l'apoptose des ostéocytes (/mm<sup>2</sup>) dans la zone corticale osseuse – Parallèle avec le mécanostat.**

Les hauts et les faibles niveaux de contraintes corréleront avec l'apoptose ostéocytaire et les pertes osseuses décrites dans la théorie du mécanostat (ligne en pointillés). À l'inverse, la présence des ostéocytes aux niveaux intermédiaires de contraintes corréleront avec les gains osseux du mécanostat. Ainsi est établie une relation en "U" voire en "J" entre l'apoptose ostéocytaire et les niveaux de contraintes reçus par le tissu osseux.  
Source: adapté de (Noble et al., 2003).

Nous allons voir par la suite que certains signaux défient la théorie du mécanostat.

## 2. Vers de nouveaux signaux mécaniques

Au 18<sup>ème</sup> siècle, Hermann von Meyer, un anatomiste allemand, et Karl Culmann, un compatriote ingénieur en chemins de fer, comparèrent des images d'arrangement trabéculaires de fémurs humains avec des profils mathématiques de stress dans certaines structures. Leur travail attira l'attention du chirurgien allemand Wilhelm Roux (Roux, 1895), qui le premier, fit allusion à une adaptation fonctionnelle du tissu osseux, avant que l'allemand Julius Wolff formule sa loi reliant la forme et la structure osseuse (Roesler, 1981). La loi de Wolff définit que tout changement de forme et de fonction d'un os est suivie par des altérations secondaires dans son architecture externe et interne, en accord avec des lois mathématiques (Wolff, 1892). On sait depuis cette époque que les activités physiques, dites à impact, permettent d'augmenter la masse osseuse (changement de "forme" pour une fonction de résistance). Le tissu osseux est en effet doté d'une capacité d'adaptation remarquable, grâce au remodelage osseux, lui permettant de faire face aux stress mécaniques qu'il peut subir, comme décrit plus haut. Ces observations ont débouchées sur la caractérisation de plusieurs signaux mécaniques ostéogènes de fortes amplitudes et de basses fréquences et l'élaboration du mécanostat (cf. B. Chapitre II-1.4. Le mécanostat). Mais depuis le récent passage à un nouveau millénaire, d'autres types de signaux ont été montrés ostéogènes: les signaux de basses amplitudes et de

hautes fréquences, ainsi en contradiction avec les lois du mécanostat. Ces signaux sont extrêmement intéressants du fait qu'ils peuvent être appliqués aux personnes ostéoporotiques, souvent âgés et ne pouvant plus effectuer d'activité physique, leur permettant ainsi d'entretenir leur capital osseux. Par ailleurs, dans un contexte d'ingénierie du tissu osseux, ces signaux trouvent leur utilité, car sont non destructifs des matériaux (Dumas et al., 2009).

## 2.1. Quelques notions physiques

Plusieurs paramètres qualifient un signal mécanique et peuvent définir la réponse osseuse: amplitude, fréquence, durée et forme du signal.

*In vitro*, la forme des signaux mécaniques expérimentés est contrôlée, pour tenter de comprendre l'importance d'un paramètre physique par rapport à l'autre. Les signaux dits de formes complexes sont en fait des sommes de signaux simples, de formes sinusoïdales. Dans un signal purement sinusoïdal et périodique, l'amplitude et la fréquence du signal sont regroupées dans une même équation, décrivant le mouvement de l'objet:

$$(1) Y = A \sin \omega t$$

avec  $\omega = 2\pi f$

Y représente un point isolé du mouvement.

A en mètre (m), représente l'**amplitude** maximale du mouvement.

f en hertz (Hz), représente la **fréquence** du mouvement, soit le nombre de répétition du signal périodique par seconde.

De cette formule découle les équations de la vitesse et de l'accélération du mouvement. En effet, la vitesse représente les variations de positions d'un point isolé par rapport au temps, donnée en  $m.s^{-1}$  dans le système international (SI). Ainsi, la formule de la **vitesse** d'un mouvement sinusoïdal périodique se définit comme la dérivé du mouvement (1):

$$(2) V = A\omega \cos \omega t$$

L'accélération du mouvement représente les variations de vitesse par rapport au temps, donné en  $m.s^{-2}$  dans le SI ( $1g = 9.81 m.s^{-2}$ ). Ainsi, la formule de l'**accélération** d'un mouvement

sinusoïdal périodique se détermine par la dérivée de la vitesse (2), ce qui, en valeur absolue, est déterminé par la formule:

$$(3) G=A\omega^2\sin\omega t$$

Un autre paramètre définit les variations d'accélération par rapport au temps, donné en  $m.s^{-3}$  dans le SI. Ce paramètre, le **jerk**, se détermine donc par la dérivée de l'accélération (3), déterminé par la formule:

$$(4) J=A\omega^3\cos\omega t$$

Les signaux mécaniques, qu'ils soient sinusoïdaux ou non, peuvent être définis par la force ou le déplacement qu'ils vont occasionner au niveau de l'objet contraint. Une mesure courante de la **force** est le Newton, noté N. Si cette force est ramenée à une surface, on parlera de **pression**, exprimée en Pascal (Pa). Le **déplacement** qu'une force provoque sur un matériau est quantifié en strain, noté  $\varepsilon$ , avec  $1\varepsilon=100\%$  de déformation du matériau soit  $1000\mu\varepsilon=0.1\%$  de déformation. Cette unité est couramment utilisée dans le champ du tissu osseux.

## ***2.2. Des stimulations de hautes amplitudes et de basses fréquences (ha/bf)***

### **2.2.1. A l'échelle tissulaire**

L'exercice physique lié aux sports dit "à impacts" (dans lesquels une charge est reçue par le squelette, comme dans l'haltérophilie ou la course à pied), est le modèle par excellence de l'étude des effets des contraintes de fortes amplitudes et de basses fréquences (ha/bf), même si les effets purs de la contrainte mécanique sur l'os dans ces activités sont difficiles à discerner, du fait que ces dernières engendrent de nombreuses modifications physiologiques (cardio-vasculaires, ventilatoires, métaboliques et hormonales), toutes susceptibles de modifier la réponse osseuse. Néanmoins, de nombreuses données illustrent la capacité ostéogénique de ces exercices, dont le déplacement est supérieur à  $1000\mu\varepsilon$  et la fréquence inférieure à 5Hz.

En effet, des rats soumis à des séances de tapis roulant présentent une augmentation du volume osseux, d'intensité différente suivant les régions tibiales considérées (Bourrin et al., 1995). De jeunes athlètes pratiquant l'haltérophilie présentent une densité minérale osseuse

(BMD) plus importante que des sujets contrôles de même âge à tous les sites osseux et présentent même une BMD plus importante que des sujets adultes dans la colonne vertébrale et le col fémoral (zones de fortes surcharges mécaniques chez l'haltérophile) (Conroy et al., 1993). Une étude portant sur des sports à raquette (tennis, squash) montre que l'augmentation du contenu minéral osseux (BMC) se restreint aux sites osseux contraints (augmentation de 12,18% pour le bras dominant par rapport au bras non dominant) (Kannus et al., 1995).

Les exercices physiques dans lesquels aucun impact évident ne se produit ne montrent en revanche aucun effet ostéogénique; une étude portant sur des athlètes de différents sports (triathlètes, nageurs, cyclistes) montre que seuls les triathlètes ont une BMD plus importante que les individus contrôles (Maimoun et al., 2004), laissant supposer que la composante course à pied de leur sport leur est bénéfique. D'autres données illustrent ce manque d'efficacité de la natation (Taaffe et al., 1995) et du cyclisme (Stewart and Hannan, 2000) sur le tissu osseux.

Ainsi, seulement les sports "à impact", c'est-à-dire ceux dans lesquels des ha/bf sont présents (Fritton and Rubin, 2001; Granhed et al., 1987), permettent un gain osseux, si toutefois la pratique de l'activité physique est soutenue dans le temps (Nordstrom et al., 2005). Cette réponse est alors contrainte-dépendante (Rubin and Lanyon, 1985; Vainionpaa et al., 2006) jusqu'au domaine évoqué précédemment (cf. B. Chapitre II-1.4. Le mécanostat) où des effets délétères surviennent (Rockwell et al., 1990).

### 2.2.2. A l'échelle cellulaire

Les études traitant de l'impact des contraintes mécaniques au niveau cellulaire se sont quasiment toutes intéressées à l'impact de très hautes amplitudes, amplitudes qui causeraient la fracture si elles étaient appliquées à l'os entier, car seules ces amplitudes étaient capables, pensait-on, d'induire une réponse cellulaire (Brand et al., 2001; You et al., 2000). Les stimuli comprennent généralement des paramètres supra-physiologiques, avec un déplacement largement supérieur à 1000 $\mu\epsilon$  et une fréquence généralement inférieure à 1Hz. Par ailleurs, afin de tenter d'isoler l'influence d'un type de contrainte par rapport à un autre, différents appareils de stimulations mécaniques ont été créés (Brown, 2000) générant des pressions hydrostatiques (Burger et al., 1992), des déformations du substrat (David et al., 2007), un stress de cisaillement (Kido et al., 2009) ou encore des champs électriques (Chang et al., 2006; Denaro et al., 2008).

### 2.2.2.1. Cellules ostéoblastiques

Il a largement été montré que ces contraintes mécaniques ha/bf modifiaient le comportement ostéoblastique: elles induisent une augmentation de la prolifération (Kapur et al., 2004; Kaspar et al., 2000a) selon l'état de maturation des cellules (il faut que les cellules soient différenciées pour observer une augmentation de la prolifération, sinon l'inverse se produit) (Weyts et al., 2003) ainsi qu'une stimulation de la différenciation dans la majorité des expérimentations (David et al., 2007; Jackson et al., 2006; Kokkinos et al., 2009), bien que certaines études évoquent l'inverse (Brighton et al., 1991; Kaspar et al., 2000b). Ces contraintes induisent aussi une augmentation de la production matricielle (Kaspar et al., 2000a; Liu et al., 2004; Liu et al., 2005) et de la production de molécules impliquées dans la coopération ostéoblaste-ostéoclaste (en faveur de la formation osseuse), en permettant une augmentation, dépendant de l'amplitude de déformation, de la production d'OPG, de façon concomitante à une diminution de production de RANKL (Tang et al., 2006). Ces contraintes engendrent aussi une augmentation de la production d'IL12 (interleukine inhibant la formation des ostéoclastes) (Garcia-Lopez et al., 2005). De plus, ces stimuli mécaniques induisent une augmentation du nombre et de la taille des plaques d'adhésions (Boutahar et al., 2004) avec une augmentation de marquage de la vinculine (Meazzini et al., 1998) (protéine des adhésions focales (cf. B. Chapitre II-1.1.3.2. Les plaques d'adhésion)), et provoquent des réorganisations cytosquelettiques impliquant aussi bien les microtubules (Rosenberg, 2003) que les microfilaments (Qi et al., 2005), essentiels à la mécano-traduction (1.2. La mécano-traduction). Finalement, la majorité des travaux *in vitro* montrent que les contraintes mécaniques ha/bf ont un effet ostéogénique. Ainsi, les contraintes peuvent stimuler la synthèse matricielle, la sécrétion des facteurs du remodelage osseux, et avoir des effets plus ou moins marqués sur la prolifération et la différenciation ostéoblastiques selon le modèle et le support de culture utilisé.

Les ostéocytes sont les cellules présumées spécialisées dans la perception des contraintes mécaniques (Burger and Klein-Nulend, 1999), notamment par leur nombre, leur localisation et leur connections multiples au sein du minéral osseux. Cependant, leur étude est difficile *in vivo*, dû à leur localisation au sein de l'os, les rendant largement inaccessibles. Toutefois, la première étude montrant que les ostéocytes répondaient à ce type de contrainte mécanique date d'il y a 20 ans, montrant que *in vivo*, le nombre d'ostéocytes actifs (marquage glucose-6-phosphate déshydrogénase) augmentait sous contrainte (Skerry et al., 1989). Une étude plus

récente a montrée que l'ablation spécifique des ostéocytes du tissu osseux conduisait à une perte osseuse et que ce tissu osseux, démuné d'ostéocyte, n'était plus sensible à la décharge mécanique, montrant le rôle essentiel de l'ostéocyte dans la perception des signaux mécaniques (Tatsumi et al., 2007). Depuis la création de lignées cellulaires ostéocytaires, MLO-Y4 (Kato et al., 1997), préostéocytaires MLO-A5 (Kato et al., 2001), HOB-01-C1 (Bodine et al., 1996) et les protocoles d'isolation d'ostéocytes primaires (van der Plas and Nijweide, 2005), plusieurs études *in vitro* ont pu voir le jour, sur l'effet du stress fluide ha/bf, puisqu'il est supposé se produire au sein des canalicules ostéocytaires (Bonewald and Johnson, 2008). Ainsi il a été montré que l'ostéocyte relargue du NO en réponse à ces contraintes (Klein-Nulend et al., 1995; Tan et al., 2007), ce qui lui permet de se protéger contre l'apoptose (Tan et al., 2008). Son rôle principal en réponse à la stimulation mécanique est probablement celui d'un chef d'orchestre du remodelage osseux, harmonisant les activités de formation ostéoblastiques et de résorption ostéoclastiques, aboutissant alors à une réponse ostéogénique en stimulant les ostéoblastes et en inhibant les ostéoclastes. En effet, sous flux, le ratio RANKL/OPG des ostéocytes diminue, ce qui a pour conséquence de diminuer l'ostéoclastogénèse (You et al., 2008). De plus, il a été montré que le milieu conditionné d'ostéocytes soumis à des flux inhibait la prolifération mais activait la différenciation ostéoblastique (Taylor et al., 2007; Vezeridis et al., 2006). Par ailleurs, il a été suggéré que les ostéocytes, de par leur morphologie sphérique, seraient capables de percevoir des contraintes bien, plus faibles que ce que l'on pensait (Bacabac et al., 2008). Il est aussi à noter que les extensions cytoplasmiques des ostéocytes, dont le nombre augmente sous stimulation fluide (Ponik et al., 2007), ont été montrées comme plus sensibles que le corps cellulaire à une déformation locale (Adachi et al., 2009).

### 2.2.1.2. Cellules ostéoclastiques

L'effet des contraintes mécaniques au niveau ostéoclastique n'est que peu connu, de part la difficulté d'obtention d'un nombre suffisant d'ostéoclastes purs à partir de moelle osseuse pour des études biochimiques ou de biologie moléculaire, l'inexistence de lignées commercialisées jusqu'à peu et la difficulté de cultiver ces cellules sur un substrat minéralisé (substrat naturel des ostéoclastes) en conditions dynamiques. En résumé et indifféremment du support de culture (dentine, ivoire, minéral, support recouvert de collagène de type I, lames de verres), ces quelques travaux ont montré que les stimuli mécaniques ha/bf diminuaient l'activité ostéoclastique (diminution de la formation d'ostéoclastes multinucléés et de la résorption)

lorsque ces cellules sont en coculture avec des cellules mésenchymateuses (culture de cellules de moelle ou cultures primaires) (Kim et al., 2006; Klein-Nulend et al., 1990; Rubin et al., 1997; Rubin et al., 1999; Rubin et al., 1996; Rubin et al., 2000), ainsi en accord avec le potentiel ostéogénique de ces stimulations. A l'inverse, cette activité est augmentée (augmentation de marqueurs ostéoclastiques, de la résorption ou de la production de molécules activant le métabolisme cellulaire) en culture enrichie en ostéoclastes (Chen et al., 2007; Kurata et al., 2001; Liu et al., 2007b; McAllister et al., 2000; Zhang et al., 2006b; Zhang et al., 2006c; Zhang et al., 2007). Cependant, certaines études sont en contradiction avec cette classification, avec une inhibition de fusion et d'activité de résorption de culture enrichies en ostéoclastes (Kadow-Romacker et al., 2009) ou induction de l'apoptose et inhibition de la différenciation (MacQuarrie et al., 2004), le dernier résultat étant retrouvé chez une lignée de monocytes pouvant se différencier en ostéoclastes (RAW264.7) (Suzuki et al., 2008).

Quoiqu'il en soit, les ostéoclastes, comme l'indiquent avec quasi certitude les cultures enrichies (il est peu probable que la faible fraction de cellules non ostéoclastiques persistante puisse procurer l'effet observé), pourraient ainsi être dotés, à l'instar des ostéoblastes, des ostéocytes (Cowin et al., 1991) et de nombreuses autres cellules conjonctives (Wang and Thampatty, 2006), d'une capacité de perception de l'environnement mécanique leur fournissant une régulation directe par des modifications de l'environnement mécanique.

### ***2.3. Aux stimulations de basses amplitudes et de hautes fréquences (ba/hf) – les micro-vibrations (adapté de la revue (Vico et al., 2008))***

Le potentiel de ce type de signal mécanique à modifier la morphologie osseuse a été suspecté dans une étude datant de 1990 (Rubin et al., 1990) utilisant des jauges fixées sur les membres de différents animaux (mises au point bien avant (Evans, 1953; Lanyon, 1973; Lanyon et al., 1975; Lanyon and Smith, 1970). Il a été montré par cette étude et d'autres que les stimuli mécaniques rencontrés lors de la locomotion (marche, course), ou lors d'une phase statique (sujet debout, assis), induisaient des signaux de hautes amplitudes (500-2000 $\mu\epsilon$ ) se produisant à basses fréquences (<2Hz), mais aussi des signaux de basses amplitudes (<300 $\mu\epsilon$ ) se produisant à hautes fréquences (10-50Hz) (Fritton et al., 2000; Rubin et al., 1990; Turner et al., 1995b). À noter que plus les signaux ont une faible amplitude, plus ils présentent une haute fréquence et plus ils sont représentés au cours d'activités journalières (des milliers de fois), à l'inverse des signaux de hautes amplitudes, faiblement représentés, et ce quelque soit

l'espèce ou le site osseux étudié (Fritton et al., 2000). Par ailleurs des études ont montré qu'une force appliquée à haute fréquence (10-20Hz) était plus ostéogène que la même force appliquée à plus basse fréquence, comme la fréquence locomotrice (1Hz) (Hsieh and Turner, 2001; Rubin and McLeod, 1994). Connaissant cette propriété des hautes fréquences et connaissant la prépondérance des signaux de basses amplitudes au cours d'activités journalières, un fort intérêt dans la compréhension des rôles de ces signaux sur le tissu osseux émerge.

### 2.3.1. A l'échelle tissulaire

L'origine de ces signaux n'est pas claire. Les hautes fréquences observées pourraient être des harmoniques des signaux de hautes amplitudes (qui se produisent à basses fréquences). Cependant, il a été montré, chez l'homme que ces harmoniques n'excédaient pas 15Hz (Antonsson and Mann, 1985). Ces signaux pourraient aussi provenir de l'activité musculaire, car ils se produisent avant l'impact de la patte au sol chez le cheval et le chien (Rubin et al., 1990; Turner et al., 1995b). De plus, des stimuli de ba/hf imposés au muscle (la contraction musculaire subséquente induit au niveau osseux des signaux de 200 $\mu\epsilon$ , 30Hz) permet de retarder l'apparition d'une ostéopénie (réduction de la masse minérale osseuse précédant l'ostéoporose) chez le rat suspendu par la queue (modèle d'hypocontrainte induisant une hypodynamie/hypokinésie du train arrière de l'animal) (Midura et al., 2005). Une autre donnée illustre cette hypothèse; une sarcopénie des fibres de type II est observée chez les personnes âgées, ce qui engendre d'une part une diminution de la force musculaire, mais aussi une diminution, dans l'activité musculaire, des fréquences allant de 30 à 50Hz (Huang et al., 1999b). La perte osseuse liée à l'âge pourrait ainsi puiser une de ces sources dans la perte des stimuli de basses amplitudes-hautes fréquences générés par le muscle (Rubin et al., 2002a), via leur attache tendineuse. Une autre hypothèse quant à la provenance de ces signaux est la filtration que les signaux de hautes amplitudes, basses fréquences pourraient subir lors de leur transition à travers la matrice extracellulaire osseuse.

Différentes études se sont donc attachées à étudier l'effet des signaux ba/hf sur le tissu osseux. Les plus illustratives sont celles de Rubin et al. (Rubin et al., 2001a; Rubin et al., 2002a; Rubin et al., 2002b). Cette équipe a montré que des sessions de 20min de signaux de faible amplitude (0,3g  $\Leftrightarrow$  5 $\mu\epsilon$ ), haute fréquence (30Hz) appliqués pendant un an aux membres postérieurs de brebis adultes, étaient capables d'augmenter la densité osseuse trabéculaire du



fémur proximal, mesurée par microtomographie, de 34,2% (Rubin et al., 2001a). Cette dernière augmentation est permise grâce à une augmentation de 32% du volume osseux trabéculaire, de 45% du nombre de travées osseuses et grâce à un doublement du taux de formation osseuse par rapport aux animaux non stimulés (Rubin et al., 2002a). L'augmentation de ces différents paramètres permet une élévation de 12,1% de la rigidité de l'os et de 26,7% de la force nécessaire à sa fracture, dans l'axe d'application du stimulus (Rubin et al., 2002b). Bien que ces changements soient restreints au compartiment trabéculaire (Rubin et al., 2002a), les différentes données illustrent le fort potentiel anabolique du stimulus mécanique considéré, en augmentant la quantité et la qualité du tissu osseux, les effets étant toutefois dépendant du site osseux considéré (pas d'effet de ces contraintes dans les vertèbres ou le fémur) (Christiansen and Silva, 2006). Par ailleurs, un signal simulant une activité physique (signal sinusoïdal; 3N-2Hz) couplé à des signaux de basses amplitudes (0,3N)-hautes fréquences (0-50Hz) appliqués sur deux jours consécutifs, 30s/jour sur des ulna murins *in vivo* a été montré comme augmentant le taux de formation osseuse d'environ 4 fois, par rapport au signal de simulation d'exercice physique seul (Tanaka et al., 2003a). De plus, dans le squelette en croissance, il a aussi été montré que les signaux ba/hf (45Hz-0.3g-5min/jr) étaient capables d'inhiber l'activité ostéoclastique trabéculaire (Xie et al., 2006). Le modèle de Whalen avait remarqué la relation inverse existant entre le nombre de cycles d'un signal et la force appliquée, afin de maintenir la masse osseuse (Cullen et al., 2001; Qin et al., 1998; Rubin et al., 2001c; Whalen et al., 1988), annonçant l'effet ostéogénique de hautes fréquences, si elles étaient appliquées à basses amplitudes (plus un signal à une haute fréquence dans un certain temps, plus son nombre de cycles est élevé).

Deux modèles de perte osseuse montrent que le potentiel ostéogénique des signaux de basses amplitudes-hautes fréquences est aussi observé dans des cas de déséquilibre du métabolisme osseux, et peut restaurer l'équilibre perdu. Un signal de 0,25g (correspondant à une amplitude inférieure à  $10\mu\epsilon$ ) appliqué à 90Hz 10min/jour pendant 4 semaines, double le taux de formation osseuse du tibia proximal de rats adultes, et prévient la perte osseuse due au modèle de décharge du train arrière, alors qu'une activité normale 10min/jour chez ces rats suspendus n'a aucun effet sur la prévention de la perte osseuse (Rubin et al., 2001b). Des signaux de 3g (correspondant, dans le système utilisé, à une amplitude d'environ  $5\mu\epsilon$ ) appliqués à 45Hz, 30min/jour sur 90 jours à des rattes ovariectomisées inhibent la résorption endocorticale (donc inhibe l'augmentation du diamètre intramédullaire) et le déclin des propriétés mécaniques de l'os dus à l'ovariectomie, et augmentent la formation osseuse périostée (montrant que les

signaux d'intérêt sont aussi actifs sur le compartiment cortical) par rapport à des individus contrôles et aux rattes ovariectomisées non stimulées (Oxlund et al., 2003).

Chez l'être humain, on conçoit tout l'intérêt qu'il y aurait à utiliser ce type de régime mécanique, non invasif, non pharmacologique pouvant être appliqué de manière passive, d'autant plus si les sujets sont fragiles voire handicapés, et non compliants pour pratiquer de manière régulière un exercice physique. Chez 70 femmes ménopausées une étude prospective, randomisée, en double aveugle d'une durée d'un an montre que des épisodes inférieurs à 20 minutes où les sujets se tiennent debout sur des tables vibrantes (<0.3g, 20-90Hz) sont capables de diminuer la perte osseuse aux sites lombaire et fémoral. La compliance est d'autant plus élevée que les sujets sont frêles (Rubin et al., 2004). Une autre étude de ce type, intéressant aussi des femmes ménopausées qui font trois séances par semaine pendant 6 mois sur des tables vibrantes (35-40 Hz, 2.28-5.09g) et pratiquent des flexions de genou montre qu'il y a un gain osseux du fémur proximal et une augmentation de la force musculaire isométrique et dynamique (Verschueren et al., 2004). Enfin, tout récemment, des effets osseux à tendance positive ont aussi été mesurés chez des femmes avant la ménopause, soumises à un régime de 0.2 g à 30Hz, 2 × 10min/jour pendant un an. Le bénéfice sur l'activité des muscles des membres inférieurs est aussi noté chez des sujets plus jeunes (Roelants et al., 2006). A l'inverse de ces données, une étude récente ne montre aucun bénéfice des signaux ba/hf chez le rat âgé (22 mois), au contraire de l'individu adulte (7 mois) (Lynch et al., 2010) ou en croissance (souris de 8 mois) (Xie et al., 2008).

### 2.3.2. A l'échelle cellulaire

Peu d'équipes ont étudié l'effet des signaux ba/hf au niveau cellulaire. Les rares études relatant d'effets *in vitro* des ba/hf se sont intéressées aux ostéoblastes. Tanaka et al. (Tanaka et al., 2003b), reprenant le couplage de signaux qu'ils avaient utilisé *in vivo* (Tanaka et al., 2003a), de haute amplitude (3000µε)-basse fréquence (3Hz) avec les signaux ba (300µε) hf ("bruit " de 0 à 50Hz) ont montré que les ostéoblastes (lignée murine MC3T3-E1) cultivés à l'intérieur de gels collagéniques sont plus sensibles au signal couplé qu'au signal sinusoïdal seul (application 3min/jour pendant 3 ou 7 jours), par une augmentation d'expression des ARNm de l'ostéocalcine (molécule de la matrice extracellulaire osseuse, marqueur terminal de différenciation ostéoblastique) à 8 jours de culture. Une augmentation de l'expression des ARNm codant pour la MMP9 (métalloprotéinase dégradant certains composants de la matrice extracellulaire osseuse, marqueur de remodelage osseux) est observée à 4 jours de culture

pour les cellules seulement stimulées par le signal ba/hf. Il est de plus à noter que le signal sinusoïdal ha/bf seul n'a aucun effet sur les différents paramètres étudiés dans ces travaux.

Bacabac et al. (Bacabac et al., 2006), utilisant des signaux sinusoïdaux dont la fréquence s'étale jusqu'à 100Hz (et les accélérations jusqu'à 30g, générant des amplitudes de déformation du support négligeables, ceci pendant 5 min), ont montré, sur la même lignée ostéoblastique (MC3T3-E1), que le paramètre discriminant dans la réponse ostéoblastique à la contrainte mécanique pourrait être le jerk (dérivée de l'accélération, c'est-à-dire le "taux" d'accélération exprimé en  $m/s^3$ ), grâce à une très forte corrélation entre ce paramètre et la sécrétion de NO ( $r=0,95$ ), et une corrélation inverse avec la sécrétion de prostaglandine E2 (PGE2) ( $r=-0,99$ ), 5 min après des stimulations de 5min.

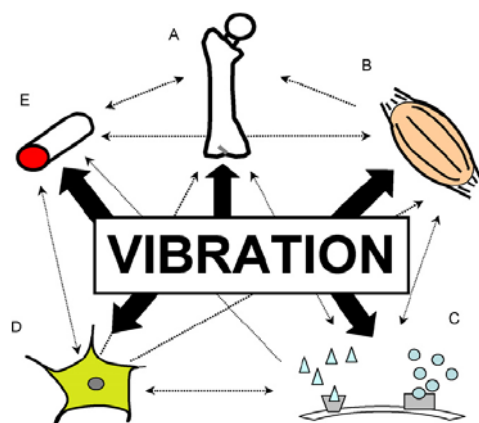
Enfin, nous pouvons noter l'étude de Patel et al. (Patel et al., 2009) qui, s'intéressant aux pré-ostéoblastes murins 2T3, ont montré que les stimuli ba/hf (0,1-0,4g à 30Hz pendant 10-60min/jr durant 21 jours) augmentaient la différenciation ostéoblastique (augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline et de la minéralisation) et prévenait la diminution de l'activité de la phosphatase alcaline et de minéralisation induite par un système de simulation microgravitaire, décrit par ailleurs (Pardo et al., 2005).

Ainsi, les ostéoblastes seraient capables de percevoir, d'analyser et de répondre aux signaux ba/hf.

### 2.3.3. Effets sur d'autres systèmes

Les signaux ba/hf n'ont pas qu'un effet sur le tissu osseux (Prisby et al., 2008). En effet des signaux de 0,2g à 90Hz appliqués pendant 15 min durant 15 semaines à des souris mâles sont capables de réduire l'adipogénèse de 27% ainsi que de réduire les facteurs à risque impliqués dans le diabète de type II (acides gras libres non saturés, triglycérides dans le foie) (Rubin et al., 2007). Plus précisément, une étude récente a montré que ces derniers signaux vont orienter les cellules souches mésenchymateuses vers la voie de différenciation ostéoblastique au dépend de la voie de différenciation adipocytaire (Luu et al., 2009). Il a aussi été montré un effet au niveau musculaire, avec une augmentation de la section du muscle soléaire après application de signaux ba/hf chez la souris (Xie et al., 2008), ou une augmentation de la force et de la masse musculaire de la cuisse après un an de micro-vibrations chez des personnes âgées, de même ordre que des exercices de fitness (Bogaerts et al., 2007), ce qui peut engendrer un effet au niveau osseux, de part les forces de tractions exercés aux attaches tendineuses. En général, le renforcement de l'appareil neuro-musculaire par les contraintes

ba/hf (Bosco et al., 2000) permet une amélioration de l'équilibre chez des personnes atteintes de maladies neuro-dégénérative (Novak and Novak, 2006; Schuhfried et al., 2005) ou chez des personnes âgées (Cheung et al., 2007). Une augmentation du flux sanguin (Lohman et al., 2007; Maloney-Hinds et al., 2008), du flux lymphatique périphérique et du drainage veineux a aussi été observé sous micro-vibrations (Stewart et al., 2005), entraînant non seulement un meilleur apport nutritif aux cellules osseuses, mais aussi une augmentation des stress de cisaillements, stimulant les cellules osseuses (cf. B. Chapitre II-1.2. La mécano-traduction). Enfin, sous stimuli ba/hf, il a été reporté que le système endocrinien pouvait lui aussi être affecté avec augmentation des taux plasmatiques d'hormone de croissance et de testostérone et diminution du taux plasmatique de cortisol (Bosco et al., 2000). Comme l'hormone de croissance (Monson et al., 2002) et la testostérone (Devogelaer et al., 1992) sont critiques pour le maintien de la masse osseuse et que le cortisol a des effets activateurs sur la résorption osseuse ainsi qu'inhibiteurs sur la formation osseuse (Manelli and Giustina, 2000), on conçoit que l'impact de ces modulations sur le remodelage osseux suivant des stimulations ba/hf soit non négligeable. L'effet des stimulations ba/hf sur le tissu osseux peut ainsi être le résultat de multiples interactions entre différents systèmes (Figure 41).

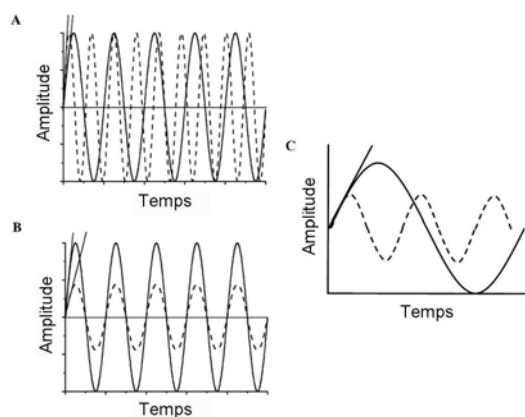


**Figure 41: Effet des micro-vibrations sur différents systèmes et relations existantes entre ces systèmes.**  
 Les micro-vibrations ont un impact sur (A) l'os, (B) le muscle, (C) le réseau endocrinien, (D) le système nerveux et (E) l'appareil vasculaire. Ces différentes influences peuvent engendrer des réponses indirectes sur le tissu osseux, via les multiples interconnexions entre les différents systèmes.  
 Source: (Prisby et al., 2008).

D'autre part, ces interactions expliquent peut être pourquoi aussi peu d'études ont pu relater des effets des signaux de basses amplitudes et de hautes fréquences *in vitro*, une intégration globale des micro-vibrations par différents systèmes de l'organisme pouvant être utile à leur potentiel ostéogénique.

## 2.4. A la recherche du déterminant mécanique de la réponse osseuse

L'aspect ostéogénique des contraintes de basses amplitudes et de hautes fréquences est contraire à la loi du mécanostat, qui établit que seules des contraintes inhabituelles sont capables de modifier la masse osseuse. Les contraintes de ba/hf sont en effet les contraintes les plus expérimentées au cours d'activité journalière (Fritton et al., 2000), laissant penser que d'autres paramètres que l'amplitude (seul paramètre physique considéré dans le mécanostat) ont une importance. L'amplitude et la fréquence sont en fait considérées comme les deux variables les plus importantes pouvant affecter l'adaptation osseuse (Turner, 1998). Mais ce serait plus le rapport entre l'amplitude des contraintes et le temps dans lequel elles sont appliquées (la fréquence), appelé le "taux" de contrainte ou "strain rate" (c'est-à-dire la pente de la courbe d'équation  $Y=Asin\omega t$ , soit sa dérivée en un point, appelée vitesse (cf. B. Chapitre II-2.1. Quelques notions physiques), qui serait le facteur déterminant la réponse des cellules osseuses (Bacabac et al., 2004; Mosley and Lanyon, 1998; Turner et al., 1995a; You et al., 2001b). Ce fait expliquerait pourquoi la formation osseuse ne peut se produire que lorsque le stimulus est dynamique. De plus, l'influence du "taux" implique que les signaux mécaniques de basses amplitudes et hautes fréquences pourraient stimuler autant les cellules osseuses que les signaux de hautes amplitudes et de basses fréquences (à "taux" de contrainte équivalent) (Figure 42) donnant une explication mécanique au maintien, voire à la stimulation, de la formation osseuse par les micro-vibrations.



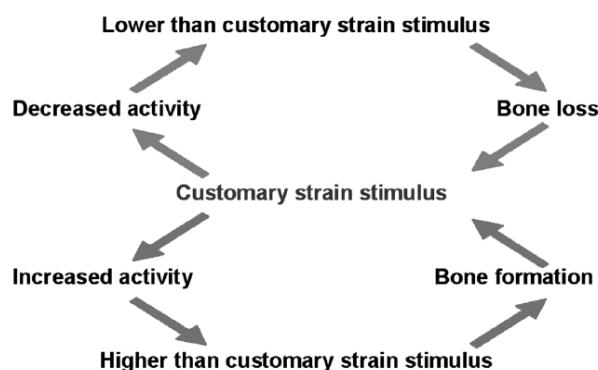
**Figure 42: Le taux de contrainte ou "strain rate" serait un paramètre physique important de la réponse osseuse.**

Les différents graphiques représentent le mouvement sinusoïdal d'un objet en fonction du temps. En (A), les mouvements de deux objets différents ont la même amplitude. Dans ce cas, si la fréquence d'un des deux objets

est augmentée, cela engendrera une augmentation de son "strain rate" (le "strain rate" maximum est représenté par la pente de la courbe en son point d'inflexion, pente supérieure pour la courbe avec la plus haute fréquence, en pointillés). De même (B), lorsque deux objets ont la même fréquence, la diminution de l'amplitude engendrera une diminution du "strain rate" maximum (pente inférieure pour la courbe en pointillés). En (C) sont représentés deux signaux ayant la même pente, c'est-à-dire le même "strain rate" maximum, bien que l'un des signaux soit de haute amplitude et de basse fréquence alors que l'autre est de plus basse amplitude et de plus haute fréquence. Source: adapté de (Bacabac et al., 2004).

D'autres données suggèrent l'importance du nombre de cycle dans le signal (Qin et al., 1998) ou des phases de pauses entre des signaux successifs (Robling et al., 2002; Srinivasan et al., 2002). Par ailleurs certains ont supposé que l'accélération ou même le jerk (Bacabac et al., 2006), seraient les déterminants majeurs de la réponse osseuse. Hors, ces paramètres ne sont que des dérivés de l'équation du mouvement initial (1), ce qui ne fait qu'augmenter les corrélations entre les observations et ces paramètres, étant donné que ces corrélations seront affectées au carré ou au cube (cf. B. Chapitre II-2.1. Quelques notions physiques, équation 4). Cette supposition nous semble donc être basée sur un artéfact mathématique.

Ainsi, du fait de la complexité des signaux physiques expérimentés par le tissu osseux, il s'avère difficile d'isoler un paramètre "roi". C'est probablement la combinaison d'un ou plusieurs paramètres qui affectera le remodelage osseux et déterminera la réponse osseuse au stress mécanique. Ainsi, ces différents paramètres sont à inclure dans la théorie du mécanostat (Figure 43).



**Figure 43: Régulation supposée améliorée de la masse osseuse par l'amplitude des contraintes**

Le stimulus de contrainte regroupe différents paramètres tels l'amplitude, la fréquence, l'accélération la durée du signal, des répétitions... Ces différents paramètres ont tous un rôle dans la réponse osseuse et doivent donc être inclus à la théorie du mécanostat.

Source: (Skerry, 2006)

### **2.5. Hautes ou basses amplitudes...Un paradoxe...**

Les contraintes générées *in vitro* sur les cellules osseuses doivent être bien supérieures à celles employées *in vivo* pour générer une réponse biologique du tissu osseux. Ce paradoxe peut être expliqué de deux manières opposées dans leur conception:

- la première vise à accréditer les fortes contraintes mécaniques nécessaires à développer une réponse biologique *in vitro*; en effet, *in vivo*, les cellules osseuses subissent un flux liquidien qui peut amplifier la contrainte reçue (Cowin and Weinbaum, 1998; Han et al., 2004). Ainsi, la contrainte mesurée au niveau tissulaire par des jauges, peut être largement amplifiée par ce flux au niveau cellulaire. Selon cette théorie, seules de fortes contraintes mécaniques peuvent stimuler les cellules osseuses.

- la deuxième accrédite les plus faibles contraintes mécaniques nécessaires à développer une réponse biologique *in vivo*; comme nous l'avons vu, le microenvironnement des cellules osseuses est tridimensionnel et a une composition particulière, que l'on ne retrouve pas dans les boîtes de culture utilisées *in vitro*. Dans leurs lacunes, les ostéocytes ont ainsi une morphologie sphérique, éloignée de leur morphologie *in vitro* (Murshid et al., 2007; Tanaka-Kamioka et al., 1998; Vatsa et al., 2008). Bacabac et al. ont pu montrer qu'un ostéocyte sphérique (donc présentant un cytosquelette décontracté) est capable de sentir de très faibles contraintes mécaniques (Bacabac et al., 2008). Selon cette théorie, une cellule osseuse peut ainsi être stimulée par de faibles contraintes mécaniques.

## C. OBJECTIFS



## C. OBJECTIFS

La matrice osseuse variant au cours du cycle de remodelage, notamment dans son contenu en minéral, et le support de culture influant sur le comportement cellulaire, nous avons voulu connaître l'effet de différents degrés de minéralisation du collagène de type I sur le comportement de cellules ostéoblastiques, recréant ainsi les matrices rencontrées lors du remodelage osseux.

Nous avons utilisé un support biphasique formé d'un revêtement de collagène de type I complexé à du minéral de structure apatitique dont on peut faire varier la fraction. Ce matériau nommé ACC (Apatite Collagen Complex), a été utilisé pour diverses études concernant les ostéoclastes (Destaing et al., 2005; Doi et al., 1996; Lees et al., 2001; Saltel et al., 2004; Shibutani et al., 2000). Nous avons choisi le modèle du pré-ostéoblaste MC3T3-E1 afin de cibler l'influence du micro-environnement sur les événements précurseurs à la phase de formation.

Nous avons étudié en premier lieu la relation que pouvait établir le pré-ostéoblaste avec ces supports de collagène minéralisé. Nous avons pour cela investigué la morphologie, l'activité, l'adhésion et la migration ostéoblastique en fonction du degré de minéralisation, donnant un aperçu de la fonctionnalisation du matériau opéré par les pré-ostéoblastes, éléments relatés dans un premier article.

Les modifications morphologiques engendrées par le degré de minéralisation du collagène de type I nous ont amenées à considérer l'aspect de mécano-traduction et plus globalement de modifications de mécanique cellulaire des pré-ostéoblastes cultivées dans ces mêmes conditions. Ces éléments font l'objet d'un deuxième article. En supplément de cette étude vient la capacité de différenciation vers la voie ostéoblastique de cellules souches mésenchymateuses cultivées en conditions "permissives", sur matériaux minéralisés.

Enfin, les modifications de morphologie et de mécanique cellulaire des pré-ostéoblastes cultivés sur supports de collagène minéralisé nous ont amenés à étudier l'influence des micro-vibrations sur les pré-ostéoblastes cultivées sur ACC de différents degrés de minéralisation.

# D. RESULTATS ET DISCUSSION

**Chapitre I. Le degré de minéralisation du collagène augmente de façon dose-dépendante le dépôt d'une matrice similaire à une ligne cimentante par des cellules pré-ostéoblastiques (Article I).**

*Article accepté dans Bone, 18 mars 2010, sous presse.*

### **Présentation de l'Article I:**

La matrice osseuse, principalement composée de collagène de type I et d'apatite, est continuellement modifiée au cours du remodelage osseux, mettant les cellules osseuses au contact de différentes proportions minéralisées de collagène. Par ailleurs, les supports formés de collagène minéralisé ont été montrés comme augmentant les activités ostéoblastiques, notamment en chirurgie orthopédique et dentaire. Nous avons émis l'hypothèse que de tels effets pouvaient passer par une sécrétion rapide de facteurs de croissance et/ou le dépôt de protéines matricielles spécifiques, soit une fonctionnalisation spécifique du matériau.

### **Article I:**

**Apatite content of collagen materials dose-dependently increases pre-osteoblastic cell deposition of a cement line-like matrix.**

A. Perrier<sup>a,b</sup>, V. Dumas<sup>a,b</sup>, M.T. Linossier<sup>a,b</sup>, C. Fournier<sup>a,b</sup>, P. Jurdic<sup>c</sup>, A. Rattner<sup>a,b</sup>, L. Vico<sup>a,b</sup>, A. Guignandon<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>: Université de Lyon, F42023, Saint-Etienne France

<sup>b</sup>: INSERM U890, Laboratoire de Biologie du Tissu Osseux, IFR143, F42023 Saint-Etienne France

<sup>c</sup>: IGFL, Lyon France

**Abstract:**

Bone matrix, mainly composed of type I collagen and apatite, is constantly modified during the bone remodeling process, which exposes bone cells to various proportions of mineralized collagen within bone structural units. Collagen-mineralized substrates have been shown to increase osteoblast activities. We hypothesized that such effects may be explained by a rapid secretion of specific growth factors and/or deposition of specific matrix proteins. Using MC3T3-E1 seeded for 32 hours on collagen substrates complexed with various apatite contents, we found that pre-osteoblasts in contact with mineralized collagen gave rise to a dose-dependent deposit of Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) and RGD-containing proteins such as osteopontin (OPN) and fibronectin (FN). This RGD-matrix deposition reinforced the cell adhesion to collagen-mineralized substrates. It was also observed that, on these substrates, this matrix was elaborated concomitantly to an increased cell migration, allowing a homogeneous coverage of the sample. This particular surface activation was probably done firstly to reinforce cell survival (VEGF-A) and adhesion (OPN, FN) and secondly to recruit and prepare surfaces for subsequent bone cell activity.

Key-words: Apatite, pre-osteoblast, osteopontin, VEGF-A, migration

### **Introduction:**

Bone is a biphasic material comprising an organic part for which the major component is type I collagen, and a mineral part presenting similarities with hydroxyapatite (HA) (Posner, 1985). This mineralized matrix is renewed during life by a physiological process called bone remodeling (Parfitt, 1982), and through which organisms respond to metabolic (calcium-phosphate metabolism) and mechanical demands. A bone remodeling cycle is accomplished by bone multicellular units (BMUs), in which bone cells interact with matrices with various degrees of mineralization (d.o.m.), between and within basic structural units (Follet et al., 2004; Meunier and Boivin, 1997), depending on the rate of bone remodeling (Boivin and Meunier, 2002).

Since the 90's (Mehlich et al., 1990), collagen, the natural polymer of bone, has been increasingly used (Hsu et al., 2005; Wahl and Czernuszka, 2006; Wang et al., 2008) in association with HA as implants. During new bone formation in the host, guided by these resorbable implants (Langstaff et al., 2001), bone-forming cells encounter various d.o.m. of the scaffold. As it has long been known that the d.o.m. varies during the bone remodeling cycle and after scaffold implantation - in both cases predominantly in a collagen matrix - it is surprising that the osteoblast behavior under these conditions has been so rarely studied. Nevertheless, increasing the d.o.m. has been shown to, in association with polymethylmethacrylate, increase osteoblast adhesion plaques (Dalby et al., 2002b) and, in association with polyethylene, increase osteoblast proliferation and differentiation (Di Silvio et al., 2002). Furthermore, increasing the d.o.m. without any organic substrate has led to a raise in the osteogenic differentiation of stromal cells as well as to a decrease of their attachment (Anada et al., 2008). Studies on HA/collagen surfaces have been found to enhance osteoblast proliferation and differentiation (Chen et al., 2008) and also improve filopodial extensions (Zhu et al., 2006), and altered spreading (Hanagata et al., 2007).

The present article puts forward the hypothesis that the positive effects of mineralized materials on osteoblast activities may be explained by a rapid secretion of specific growth factors and/or matrix deposition of specific matrix proteins. Actually, it has been demonstrated that extracellular matrix proteins can initiate the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (Huang et al., 2009b) and that RGD-containing proteins are critically involved in osteoblast survival (Globus et al., 1998), adhesion (Bernards et al., 2008) and

differentiation (Gordon et al., 2007). In this context, the effects of the d.o.m., *in vitro*, on the ability of osteoblastic cells to functionalize materials have been assessed. For this purpose, a substrate that has previously been used for osteoclast studies was chosen, i.e., the Apatite Collagen Complex (ACC). In this substrate, the deposition of the mineral phase, characterized to be apatite crystals similar to bone by X ray diffraction (Saltel et al., 2004; Shibutani et al., 2000), on a type I collagen coating can be precisely controlled. ACCs with various collagen d.o.m. were characterized and the pre-osteoblastic cell growth, viability, matrix protein-integrin expression, attachment behavior and migration on these osteomimetic substrates were examined. We showed that pre-osteoblastic cells, when plated on ACCs of increasing d.o.m., rapidly and proportionally increased their secretion of Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A), their expressions of RGD-containing matrix proteins, notably osteopontin (OPN) and its ligand  $\beta$ 3-integrin, leading to an improved adhesive behavior. Moreover, a homogenous matrix deposition was observed concomitantly to an increased cell migration on the collagen-mineralized substrates.

## **Materials and Methods:**

### **Reagents and antibodies:**

35-mm culture-treated dishes were obtained from Falcon. Goat anti-rabbit alexa fluor 488 antibody and a PicoGreen DNA quantitation kit were purchased from Invitrogen. The Live/Dead Viability/Cytotoxicity Assay Kit for mammalian cells was received from Molecular probes, and the murine VEGF ELISA development kit was from AbCys. All other reagents were purchased from Sigma.

### **Apatite Collagen Complexes (ACCs):**

ACCs were prepared using a previously described method (Shibutani et al., 2000) with slight modifications. Briefly, 35-mm cell culture-treated dishes (TCPS), coated with a 0.1mg/ml calf skin type I collagen (buffered in 0.1M acetic acid), were immersed in various baths based on Tris-Buffered Saline (TBS), pH=8.5. The first bath contained alkaline phosphatase and egg yolk phosphovitin (0.13 mg/ml) at 37°C, and the second contained calcium  $\beta$ -glycerophosphate (6 mM) at 37°C. The dishes were finally washed with water and the ACCs were dried and stored at 4°C before use. This successive immersing induced the deposition of an apatite-mimicking bone mineral on the plates (Doi et al., 1996; Shibutani et al., 2000). The duration and the number of successive incubations determined the amount of apatite mixed with the collagen.

The choice was made to study three d.o.m., ranging from 0 (pure collagen coating=ACC0) to 50% apatite complexed with collagen. By varying the durations of the first and the second baths, it was possible to control the amount of apatite mixed with collagen. A 3-10h (first bath-second bath) cycle provided an ACC where 25% of the collagen surface was mixed with apatite; it is hereafter denoted ACC25. A 3-20h cycle, repeated twice, provided an ACC where 50% of the collagen surface was mixed with apatite; hereafter named ACC50. In the following, ACCX is used when referring to either ACC25 and ACC50. The determination of the d.o.m. is explained in the image analysis section. TCPS was used as a control substrate.

### Cell culture:

The MC3T3-E1 pre-osteoblastic cell line derived from C57BL/6 mouse calvaria was obtained from ATCC (CRL-2593). MC3T3-E1 cells (within passage 18) were maintained in T75 flasks in  $\alpha$ MEM supplemented with 10% fetal calf serum (ATGC Biotechnologies, Marne-la-Vallée, France, batch 916996), 2-mM L-glutamine and antibiotics (50U/ml penicillin, 50  $\mu$ g/ml streptomycin) in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

Cells in T75 were rinsed with citrate buffer and trypsinized upon subconfluence using 1X trypsin-EDTA and seeded in 2 ml of the medium used for the cell maintenance. Cell seeding was normalized to  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> on TCPS, ACC0, ACC25 and ACC50, to reach an identical cell number regardless of the substrate, 32h after seeding.

### Cell growth:

The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was used to evaluate population growth. MTT was converted by a mitochondrial enzyme, active only in living cells, to yield a dark blue/purple formazan product. The density of the product determined at 570 nm was directly related to the number of viable cells. Samples were incubated (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) with 0.5 mg/ml MTT for 2 hours, after which 2 ml of DMSO was added for crystal solubilization before reading with a multiwell plate spectrophotometer (Multiskan spectrum microplate spectrophotometer).

### Viability:

The viability of the cells on the various substrates was evaluated using the Live/Dead Viability/Cytotoxicity Assay Kit (Chou et al., 2005b). Briefly, staining was used to distinguish dead cells (red cells, stained with ethidium homodimer) from live ones (green cells, stained with calcein AM). The culture media was aspirated, and the dishes were rinsed once with sterile PBS. 150  $\mu$ l of the live/dead stain working solution was added into each culture dish. After 30 min of incubation at room temperature, the dishes were washed, immersed in PBS and observed with a fluorescence microscope (Leitz DMRB). Images were acquired with a Roper Scientific CoolSnapfx camera using the Meta Imaging series 4.6.6 software. Subsequently, the number of living and dead cells was counted.



### VEGF ELISA:

The VEGF content was measured in sample lysates (matrix-bound VEGF) and medium (soluble VEGF) with an ELISA kit, according to the manufacturer's instructions. Briefly, samples were lysed in lysis buffer composed of PBS with 0.5% Nonidet 40, and 1% PIC (proteases inhibition cocktail). Each sample was run in duplicate in the assay and fluorescence was determined with a multiwell plate spectrophotometer (Multiskan spectrum microplate spectrophotometer). The data were corrected for fresh lysis buffer values, determined from a standard curve and normalized with regard to the DNA content of the cell lysate, measured with a PicoGreen DNA quantitation kit.

### DNA measurement:

The PicoGreen DNA quantitation kit was used to measure double-stranded DNA concentrations in solution. All reagents (dsDNA reagent, TE buffer: 200mM Tris-HCl, 20mM EDTA, pH7.5 and lambda DNA standard) were obtained from the kit and the assay was performed as outlined in the protocol from the manufacturer. The data were corrected for cell free values. Samples were placed in a black 96-well plate and excited at 485 nm. The emission was measured at 538 nm using a fluorometer (Fluoroscan Ascent, Thermo Labsystems).

### RNA extraction and RT-PCR:

To isolate total RNA for quantitative RT-PCR, samples were lysed with the Trizol buffer (Roche, Hague Road, Indianapolis). The cell lysate was transferred to QiaShredder (Qiagen, Inc., Valencia, CA) columns for RNA purification. RNase-Free DNase (Roche) was used to eliminate DNA contamination of the RNA samples. Purified RNA was dissolved in RNase-free water and its concentration was assessed at 260 nm. The RNA quality was verified on a 2% agarose gel with 1 µg/ml ethidium bromide. Samples were stored at -80°C until use. Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 2 µg of total RNA with the 1st strand cDNA synthesis Kit for RT-PCR (AMV, Roche, Hague Road, Indianapolis).

8  $\mu$ l of a cDNA mixture diluted 1:20 in water were subjected to real-time PCR using SYBR Green I dye (Lightcycler faststart DNA master SYBR green I, Roche, Penzberg, Germany). Reactions were performed in a 20  $\mu$ l PCR mixture containing 4  $\mu$ l 5x Master Mix (dNTP mixture with dUTP instead of dTTP, MgCl<sub>2</sub>, SYBR Green I dye, Taq DNA Polymerase and reaction buffer), 2  $\mu$ l of 10  $\mu$ M primers. The primer sequences of vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), fibronectin (FN), osteopontin (OPN),  $\alpha$ 1 procollagen (Coll I),  $\beta$ 3 integrin ( $\beta$ 3) and  $\beta$ 1 integrin ( $\beta$ 1) are listed in Table 1. Cyclophilin was used as a control. Standard curves were obtained from 10-fold dilutions of total RNA from an RNA sample extracted from MC3T3-E1 cell cultures. Amplified products were examined for size estimation on a 2% agarose gel with 1  $\mu$ g/ml ethidium bromide and DNA molecular weight markers. The results were expressed as the increase in fold of gene expression on TCPS, after normalization on cyclophilin values.

#### Detachment tests:

For mechanical detachment testing, samples were rinsed 32 hours after seeding, immersed in PBS and subjected to vertical sinusoidal vibrations (30 Hz, 15 g max) using a vibration generator (TIRAvib GmbH) during 2 min at ambient temperature. For soluble RGD peptide detachment testing, GRGDSPK (50  $\mu$ M) was added to the fresh medium 24 h after seeding for 8 h. Following the detachment tests, the cells were rinsed with PBS and fixed with 4% formalin. DAPI staining was carried out and the cells were counted using the ImageJ software.

#### DAPI staining:

The samples were rinsed in PBS, fixed in 4% formalin, permeabilized with 0.1% Triton X100 and incubated with 1- $\mu$ g/ml DAPI for 45 minutes at 37°C in order to label the nuclei. The samples were examined with a Leitz DMRB fluorescence microscope, and images were acquired with a Roper Scientific CoolSnapfx camera using the Meta Imaging series 4.6.6. software. The nuclei were subsequently counted or their area measured using the ImageJ software.

#### Fibronectin immunostaining:

The samples were rinsed in PBS, fixed with 4% formalin for 30 min at room temperature and incubated with rabbit anti-human fibronectin (1:100 diluted) for 2h at 37°C, followed by an incubation with goat anti-rabbit alexa fluor 488 (1:250 diluted) for 1h at 37°C. The fibronectin area was subsequently analyzed by means of the ImageJ software.

#### Image analyses:

Image analyses were performed with the ImageJ free software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) in order to determine the percentage of mineral mixed with collagen, to count the nuclei after detachment tests, and to determine the area of samples covered by fibronectin as well as the area of nuclei. All analyses were performed after background removal and thresholding of the image. To determine the percentage of mineral mixed with collagen, 10 contrast light microscopic fields (100× magnification) of 5 independent samples were analyzed with the area fraction parameter of the particle analyzer, which allowed to discriminate between black areas (mineral) and grey areas (collagen), finally giving the area fraction of apatite mixed with the collagen coating. In order to count cell nuclei for the detachment tests, 10 microscopic fields (100× magnification) of 3 or 2 independent samples labeled with DAPI were analyzed using the count parameter of the particle analyzer for chemical and mechanical or soluble RGD detachment tests. To determine the fibronectin area and nuclei area of the same fields (double labeling), 10 microscopic fields (200× magnification) of 3 independent samples were investigated using the total area or mean area parameter, respectively, of the particle analyzer.

#### Time-lapse phase-contrast imaging:

Images of MC3T3-E1 cells were obtained under a phase-contrast videomicroscope (Carl Zeiss, Jena, Germany, model Cell Observer, HSDi, 100× magnification) with a CCD video camera (AxioCam MR, Zeiss, Jena, Germany). Fifteen hours post seeding, an image was acquired every 15 min over a period of 17 hours. The temperature (37°C) and CO<sub>2</sub> concentration (5%) were kept constant over the entire duration of the experiment. The resultant image sequences were then analyzed through specialized image analysis software (running on ImageJ) in order to quantify the cell motility, directionality and total as well as Euclidian walking distances. First, the cell nuclei were tracked using a manual tracking plugin in ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/track/track.html>) and quantitative parameters as

well as graphic representations were collected using the chemotaxis plug-in developed by IBIDI; [http://www.ibidi.de/applications/ap\\_chemo.html](http://www.ibidi.de/applications/ap_chemo.html). An average number of 60 tracks were used for each condition (two separate experiments). As illustrated by the provided supplementary material, movies were generated from these sequences to enable a rapid viewing of the cell behavior for the duration of the experiments.

Statistical analyses:

Statistical analyses were performed with the STATISTICA7.1 software (Statsoft Inc). All data were explored by one-way analysis of variance (ANOVA). When F-values for a given variable were found to be significant, comparisons among individual samples were assessed by the post-hoc method of Fisher. Results were considered to differ significantly when  $p < 0.05$ . All data are presented as mean  $\pm$  SEM.

**Results:****Substrate characterization:**

We wanted to characterize various ACC d.o.m and their reproducibility by image analyses. As can be seen in the contrast light microscopy image in Fig. 1A, the apatite mineral (black spots) could be distinguished from the collagen (grey surfaces), and the black spots covered a larger surface for ACC50 than for ACC25. The collagen (ACC0) was undistinguishable from TCPS (grey surfaces). Fig. 1B presents the percentage of minerals that was mixed with collagen as evaluated using the ImageJ free software. ACC25 presented  $27.33\pm 1.50\%$  of the collagen surface mixed with apatite, whereas ACC50 presented  $54.28\pm 0.48\%$  of the collagen surface mixed with apatite. These results showed the high reproducibility of the process of mineralization of ACCX, rendering it possible to discriminate the role of the collagen d.o.m. on cell behavior. We also examine the Calcium/Phosphate atomic ratio by way of microanalysis on ACC25. We found a value of  $1,69\pm 0,03$  (4 independent preparation of ACC25), a mean value close to the theoretical 1,67 ratio found for bone hydroxyapatite.

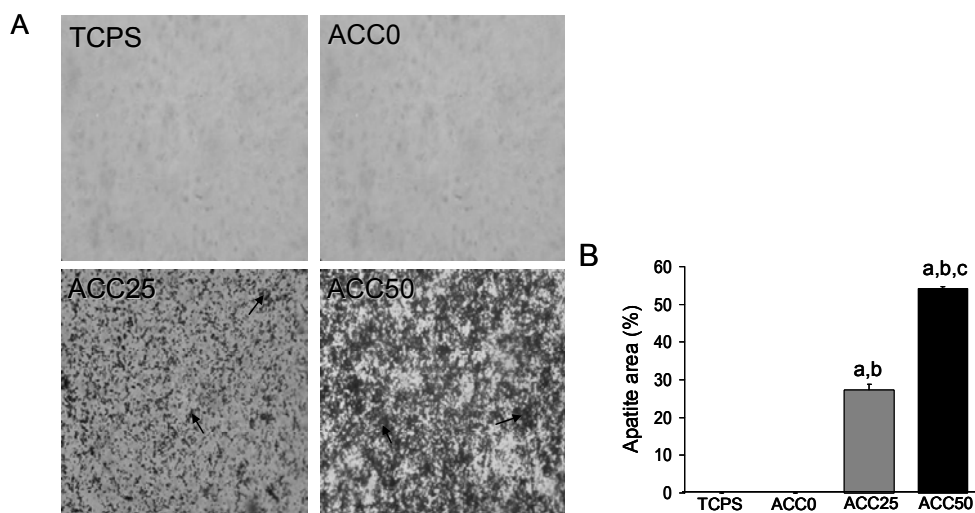


Figure 1: Substrate characterization in terms of degrees of mineralization (the number after ACC refers to the percentage of collagen surface mixed with apatite). (A) 100× magnification of representative substrates (arrow: apatite aggregate) and (B) quantification (n=50).

**Biocompatibility of ACC substrates:**

The global cell morphology was appreciated 32 hours after seeding with contrast light microscopy and the images are presented in Fig. 2A. The cells cultured on either TCPS or

ACC0 were normally spread, but as the collagen d.o.m. increased, the cells were more retracted and gave rise to more numerous cell projections, causing the cells to become smaller and thinner (Fig. 2A).

As these morphologies were not conventional for two-dimensional osteoblast cultures, the cell viability and proliferation were verified under the conditions in question. It was found that there was a good cell viability until 72h post seeding, with a cell death of less than 10% (Fig. 2B). Moreover, the cell growth was maintained regardless of the substrate (Fig. 2C). The rapid and slight increase in toxicity as well as the defect in spreading with the increase in collagen d.o.m., in the presence of a normal cell growth, led to the speculation that a rapid adaptation mechanism took place on ACCX. Consequently, investigations were carried out on how the mRNA and proteins of the anti-apoptotic agent VEGF-A, as well as the mRNAs of the matrix and adhesion proteins were modulated on the substrates, for which cell adhesion was a critical parameter when considering the biocompatibility of a surface (Brunton et al., 2004).

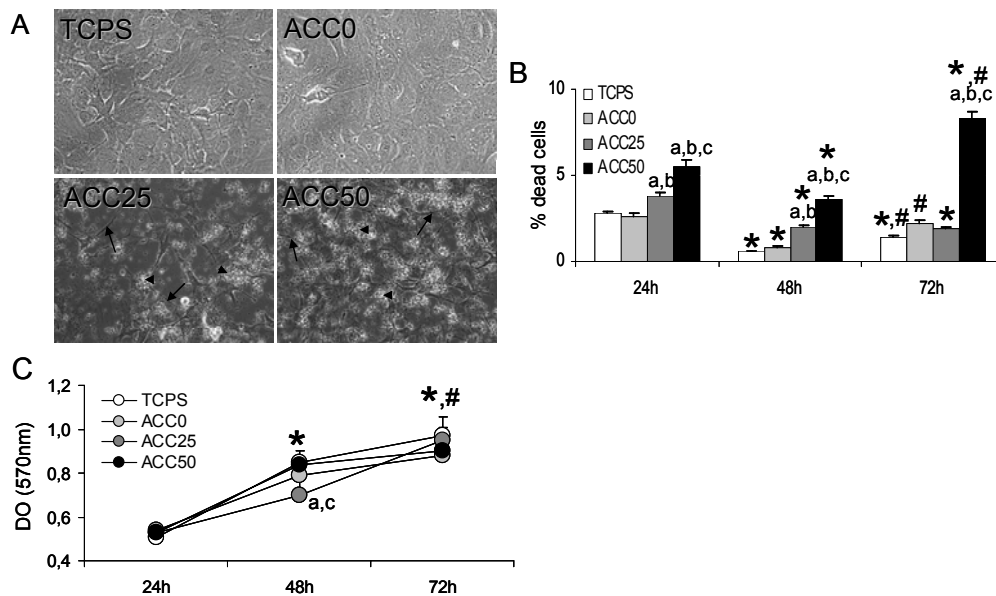


Figure 2: The biocompatibility of the various substrates. (A) Contrast light microscopy images (400× magnification) showing the MC3T3-E1 cell morphology on different substrates, 32 hours after seeding (arrowhead: apatite aggregate, arrow: cell projection). (B) The cell viability assessed using a commercial kit and by counting dead cells normalized to the total number of cells. (C) Growth curves for the various substrates evaluated by MTT assay (\*: difference vs. 24h, #: difference vs. 48h (for ACC25 only in the growth curves graph), a: difference vs. TCPS, b: difference vs. ACC25, c: difference vs. ACC50,  $p < 0.05$ ,  $n = 30$  for cell viability and  $n = 3$  for growth curves).

Phenotypic expressions of MC3T3-E1 on the different substrates:

Thirty two hours after seeding MC3T3-E1 cells the VEGF-A mRNA expression increased in a dose-dependent manner on ACC25 and ACC50 (4.5-fold and 6.5-fold, respectively) with no difference between ACC0 and TCPS (Fig. 3A). At the protein level, matrix-bound VEGF (Fig. 3B), which was undetectable on TCPS, was found to be  $0.43 \pm 0.10$  pg VEGF/ng DNA on ACC0 and presented a dose-dependent increase on ACC25 and ACC50 ( $4.51 \pm 0.33$  and  $6.32 \pm 0.37$  pg VEGF/ng DNA, respectively). Soluble VEGF (Fig. 3C) showed a tendency to increase on ACC0 vs. TCPS ( $15.77 \pm 2.33$  and  $6.09 \pm 2.49$  pg VEGF/ng DNA, respectively) and presented a dramatic increase on ACCX ( $56.66 \pm 1.43$  and  $49.55 \pm 7.00$  pg VEGF/ng DNA for ACC25 and ACC50, respectively).

Since RGD motifs are major cell-binding domains provided by FN, OPN and Coll I, investigations were performed to determine whether the mRNA of these proteins were modified by the mineralized substrates. The analyses were carried out 32 hours post seeding, and revealed a dramatic increase of FN mRNA on ACC25 and ACC50 (Fig. 3D, 7-fold and 8.5-fold, respectively), as compared to unmineralized substrates which showed no differences between them. OPN mRNA was also dramatically increased on ACC25 and ACC50 (Fig 3E, 50-fold and 40-fold, respectively) as compared to unmineralized substrates. Coll I mRNA decreased in collagen substrates, with a more pronounced decreased on ACCX (Fig. 3F, 0.7-fold and 0.2-fold on ACC0 and ACCX, respectively). Since extracellular matrix expression by MC3T3-E1 cells was increased on mineralized substrates, we wanted to determine whether integrin receptors expression could vary to the same extent.  $\beta 3$  mRNA increased on ACC25 and ACC50 (3-fold and 4-fold, respectively) with no difference between unmineralized substrates (Fig. 3G). In contrast,  $\beta 1$  mRNA was down-regulated but remained stable on ACCs (Fig. 3H,  $0.7 \times$  for ACC0 and ACCX).

These results pointed to the fact that mRNA of RGD-containing proteins, such as OPN and FN, as well as their receptor on cell surfaces, were dramatically up-regulated on ACCX, leading to speculations of whether the cell adhesion would be greatly enhanced on these substrates. Attempts were thus made – by way of mechanical and chemical detachment tests - to verify how the cell attachment would be modified.

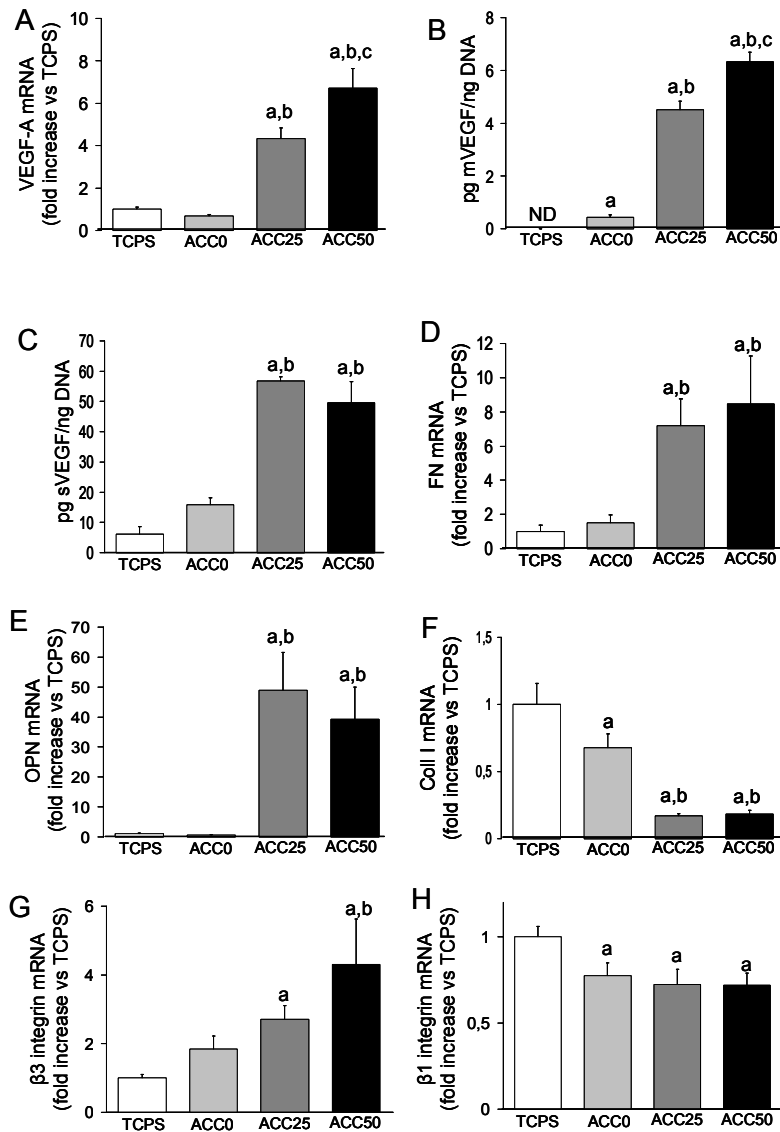


Figure 3: Phenotypic expressions of MC3T3-E1 on the various substrates: VEGF-A mRNA expression (A) quantified by RT-PCR (The values were normalized to cyclophilin mRNA level). (B) Matrix bound and (C) soluble VEGF protein dosage on the substrates. Quantitative RT-PCR results of fibronectin (D, FN), osteopontin (E, OPN), type I collagen (F, Coll I),  $\beta$ 3 integrin (G,  $\beta$ 3) and  $\beta$ 1 integrin (H,  $\beta$ 1) mRNA expressions. The values were normalized to the cyclophilin mRNA level. Results were obtained after culturing of MC3T3-E1 during 32 hours on the different substrates (mean  $\pm$  SEM, ND: non-detectable, a: difference vs. TCPS, b: difference vs. ACC0, c: difference vs. ACC25,  $p < 0.05$ ,  $n = 9$  for RT-PCR results and  $n = 5$  for matrix-bound and soluble VEGF protein dosage).

Mechanical and soluble RGD detachment tests:

Using a vibration generator, a vertical sinusoidal vibration (30Hz, 15g) was applied, 32 hours after seeding, demonstrating a collagen and d.o.m.-dependant resistance to vibration treatment. Indeed, after a 2 min treatment, almost all cells were detached on TCPS ( $4.59 \pm 0.82$



% of cells resisted treatment), but  $29.00\pm 5.77\%$ ,  $56.17\pm 11.84\%$  and  $75.14\pm 6.44\%$  of cells resisted treatment on ACC0, ACC25 and ACC50, respectively (Fig. 4A), thus demonstrating that cell adhesion was stronger in the presence of collagen, and further increased with the d.o.m..

The implication of RGD-containing protein-dependant adhesion was verified using the soluble RGD peptide GRGDSPK. An 8 hour treatment 24 hours post seeding revealed a dose-dependant detachment of cells on ACC25 and ACC50 (respectively  $61.08\pm 8.60\%$  and  $11.07\pm 1.76\%$  remained on the substrates). ACC0 did not differ markedly from TCPS with any effect of the treatment (Fig. 4B). These results confirmed that, when increasing the collagen d.o.m., cells dose-dependently favored RGD-dependent adhesive mechanisms, most likely linked to OPN, FN and  $\beta 3$  integrin, in order to adapt to the surface. Given that the cells were smaller on ACCX (same cell number; cf. Materials & Methods), as shown by contrast light microscopy (Fig. 2A), it was believed that the RGD-matrix could be deposited in packets onto ACCX.

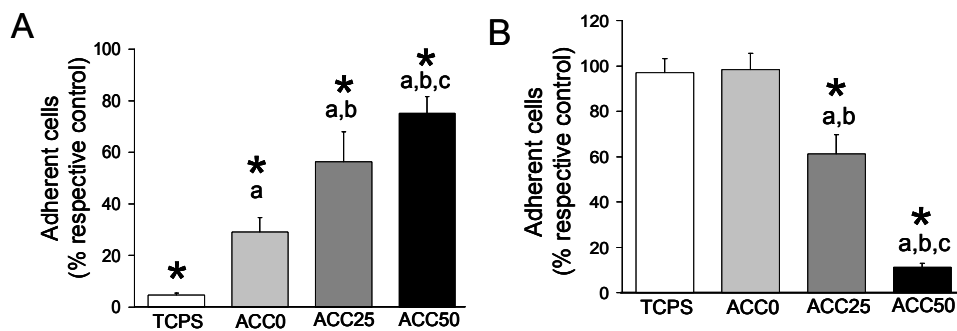


Figure 4: Mechanical and soluble RGD detachment tests on the various substrates. MC3T3-E1 were cultured for 32 hours on the substrates and were (A) subjected to a 30-Hz, 15-g max vertical sinusoidal vibration signal during 2 min. (B) MC3T3-E1 were cultured on the various substrates for 24 h and the medium was supplemented with GRGDSPK for 8h. Results are expressed as the percentages of cells remaining on each substrates after treatment (mean $\pm$ -SEM, \*: difference vs. respective control, a; difference vs. TCPS, b: difference vs. ACC0, c: difference vs. ACC25,  $p < 0.01$ ,  $n=30$  for mechanical detachment tests and 20 for soluble RGD detachment tests).

#### Fibronectin matrix deposition:

Surprisingly, 72h post seeding, the FN deposition was observed to be uniformly distributed through the sample regardless of the substrate, with an increased deposition on ACCX (Fig. 5A). However, this result was in accordance with RT-PCR data (Fig. 3D). The FN staining

area was quantified (normalized by the mean nucleus area in double labeling), and a 3-fold increase in deposition on ACCX was demonstrated (Fig. 5B), with no difference between ACC0 and TCPS. Since the matrix depositions were uniform, it was speculated that an increased cell migration on ACCX allowed the cells to functionalize the entire substrate.

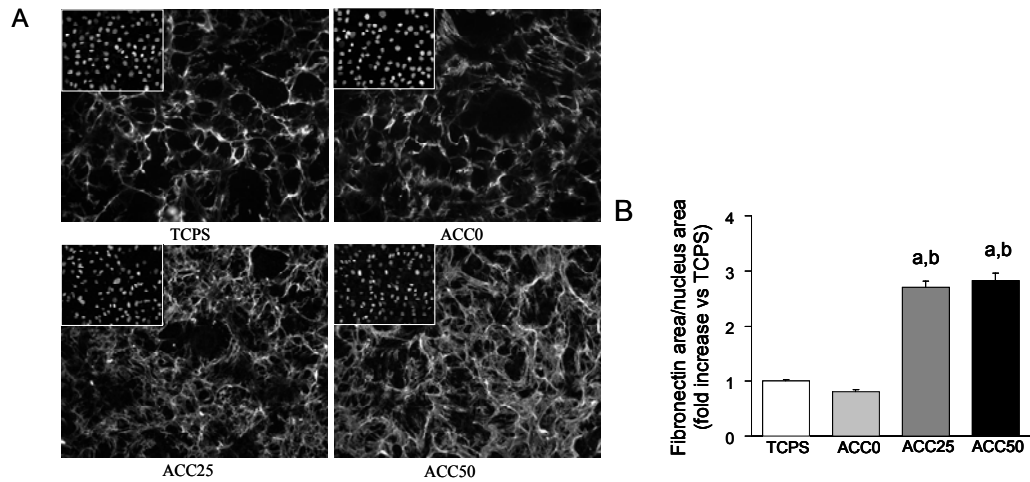


Figure 5: Fibronectin matrix deposition. (A) 200× magnification of a representative fibronectin immunostaining (Inset: respective DAPI staining, 200× magnification) and (B) quantification of the fibronectin area normalized by the nucleus area, 72 hours after seeding. The results are expressed as the increase in fold of the TCPS substrate values (mean  $\pm$  SEM, a: difference vs. TCPS, b: difference vs. ACC0, c: difference vs. ACC25,  $p < 0.05$ ,  $n = 30$ ).

#### Cell migration:

Cell tracking under time-lapse microscopy in the first hours post seeding revealed an increase in speed of cell migration on ACCX ( $0.7 \pm 0.21$  and  $0.9 \pm 0.27$   $\mu\text{m}/\text{min}$  for ACC25 and ACC50, respectively), with no difference between unmineralized substrates (Fig. 6A, supplementary data movies). Moreover, the Euclidian distance migration (i.e., the shortest distance between the initial and the final point of the migration path) increased on ACCX ( $225 \pm 76$  and  $300 \pm 92$   $\mu\text{m}$  for ACC25 and ACC50, respectively), with no difference between unmineralized substrates (Fig. 6B). Following the displacement of single cells by time lapse microscopy, it was found that cells on TCPS and ACC0 presented a low speed profile whereas on ACCX, they alternated between high speed and low speed phases (Fig. 6C). It was concluded from these data that the cells migrated faster and farther on ACCX, through a particular migration behavior.

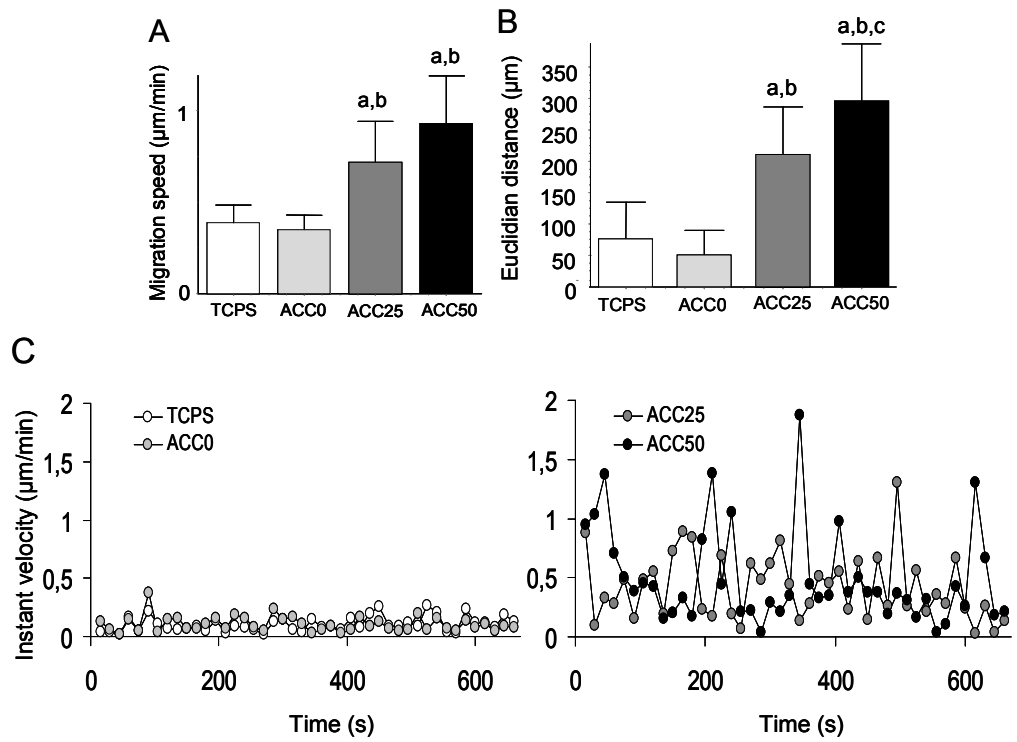


Figure 6: Cell migration on various substrates. (A) The mean migration velocity, (B) mean euclidian distance and (C) instant migration velocity of the cell (a representative profile over 11h is shown for each condition) (mean $\pm$ SEM, a: difference vs. TCPS, b: difference vs. ACC0, c: difference vs. ACC25,  $p < 0.01$ ,  $n = 60$ ).

### **Discussion:**

An interesting question was whether different d.o.m. of type I collagen could control pre-osteoblastic cell activity, adhesion and migration, leading to substrate functionalization that could explain the positive effects of HA on the osteoblast activities. The choice to employ collagen d.o.m. in this study (0 to 50%) was based on a theoretical model demonstrating that the upper possible volume fraction of mineral that could be incorporated in collagen could not exceed 42% in fully mineralized bone (Jager and Fratzl, 2000). Focus was placed on the first events of interaction of cells with the surface, since the gene expression was modulated by HA as early as 24h post exposition (Song et al., 2008; Xie et al., 2004). This indicated that cell adaptation to HA was rapid. Other data indicate that these hours of initial contact conditioned subsequent cell behavior (Anselme, 2000). Furthermore, the duration of this study was limited due to *in vivo* bone remodeling data indicating that the particular phase of cleaning/functionalization of resorption lacunae (mononuclear cells) was short as compared to the bone formation phase carried out exclusively by mature osteoblasts (Hill, 1998).

When collagen d.o.m. increased, the pre-osteoblasts became smaller and thinner with multiple cytoplasmic extensions on ACCX, which was in accordance with a large number of studies involving osteoblasts cultured on HA (Chou et al., 2005b; Kizuki et al., 2006). Cell projections are characteristic of cells cultured in a three-dimensional environment (Murshid et al., 2007) and it was thus possible that this morphology on HA was a cell adaptation favoring cell interconnection and environmental exploration as already described for fibroblasts (Grinnell et al., 2003).

Literature has shown discrepancies concerning osteoblast proliferation, i.e., it has either increased (Kim et al., 2005; Matsumura et al., 2009) or not (Shu et al., 2003; Sibilla et al., 2006) when cultured on HA. Moreover, the presence of HA has been found to be slightly cytotoxic for osteoblasts (Chou et al., 2005b). Under the conditions presented herein, pre-osteoblast growth was maintained regardless of the substrate, but a slight increase in toxicity with high collagen d.o.m. was seen, with a cell death never exceeding 10%, for up to 72h post seeding. These data represent indirect evidence of pre-osteoblasts increasing their proliferation on the mineralized substrates and of the occurrence of an adaptative mechanism to collagen/HA surfaces. In order to counteract a potential cytotoxic effect of HA, the cells develop strategies by secreting high amounts of VEGF-A, which has been shown to have an

anti-apoptotic effect on osteoblasts (Street and Lenehan, 2009). The VEGF-A entrapment, supported by specific matrix-bound isoform expressions, is often correlated to FN upregulation in osteoblasts (Dumas et al., 2009; Faure et al., 2008). Since VEGF-A entrapment and FN expression were found to dramatically increase on ACCX, it can be speculated that there was an attachment of VEGF to FN (Wijelath et al., 2002). However, one cannot exclude the implication of proteoglycans in such a process. Hence, in order to adapt to these substrates, the cells synthesized their own matrix. Moreover, it was found that the Coll I expression decreased when pre-osteoblasts were cultured on collagen and dropped on ACCX, which contradicts results from studies on bone marrow stromal cells (Anada et al., 2008) and osteoblasts cultured on HA (Ramires et al., 2001). Nevertheless, the present results are in accordance with a nicely conducted recent investigation using osteoblasts cultured on three-dimensional mineralized particles, which demonstrated a down-regulation of Coll I as well as other osteoblastic differentiation markers concomitantly with an engagement into osteocyte differentiation (Boukhechba et al., 2009). Furthermore, the decreased  $\beta 1$  integrin expression on ACCs was in accordance with its ligand expression.

Furthermore, according to the collagen d.o.m., an increased expression of RGD-containing peptides, such as OPN and FN, was demonstrated, which was in agreement with studies showing enhanced osteoblast activity on HA substrates (Moursi et al., 2002; Rizzi et al., 2001). Notably, a dramatic increase in OPN expression on ACCX was shown, in accordance with its anti-mineralization role *in vitro* (Hunter et al., 1996). This increase could not be due to soluble phosphate implication (Beck et al., 2000) since the phosphate levels in the medium of either of the substrates were below those required for OPN gene expression modulations in the timing used (Beck, 2003) (data not shown). The dramatic increase in  $\beta 3$  integrin expression with the collagen d.o.m. was in accordance with the corresponding ligand expressions.

RGD coating of surfaces has been largely employed in tissue engineering as a cell adhesion enhancer (Le Guillou-Buffello et al., 2008), with an enhance potential on HA substrates (Okamoto et al., 1998). By employing a mechanical detachment test, an enhanced adhesion on ACCs was confirmed. Such a d.o.m.-dependent resistance to cell detachment can be explained by the widely recognized adsorption of proteins on HA (Dalby et al., 2002b; El-Ghannam et al., 1999; Woodruff et al., 2007). This is the best explanation of the resistance to detachment of cells cultured on ACCX, given that soluble RGD treatment led to them becoming dose-

independently detached. Based on the above-mentioned morphological observations, cells seeded on ACCX behaved similarly to in 3D conditions, which might indicate that the ACCX were no longer flat. So, an additional explanation of the increased resistance to mechanical detachment could be attributed to the substrate roughness of ACC, which is known to promote cell adhesion (Anselme, 2000; Ismail et al., 2006; Keller et al., 2003). Additionally, the resistance to mechanical detachment of cells cultured on ACC0 can be explained by a mechanical anchorage mechanism where cell extension entanglement could occur on collagen, giving rise to an integrin-independent component of adhesion (Jiang and Grinnell, 2005)

Under the conditions presented herein, pre-osteoblastic cells revealed an early enhancement of their adhesive potential via an RGD- $\beta$ 3 integrin mechanism. OPN, the major matrix protein found in cement lines (McKee and Nanci, 1996), was deposited during the reversal phase of bone remodeling by mononuclear cells that cleaned the resorption lacunae from bone matrix leftovers by osteoclasts. This phase has been shown to be critical for subsequent bone formation (Everts et al., 2002; Romano et al., 1997), and consequently, the mimicry of such a matrix may be of particular importance in biological activation of biomaterials. It seems that the obtained pre-osteoblastic cells facing mineralized surfaces used the same functionalization protein as cells of the reversal phase. Interestingly, cement line deposition has already been attributed to cells belonging to the osteoblastic lineage (Everts et al., 2002). Furthermore, cement lines have been described to be a collagen-deficient matrix (Skedros et al., 2005), which is also in agreement with the present results.

The present paper showed that cells on ACCX were smaller, but nevertheless achieved a homogeneous RGD-matrix deposition, probably by adopting a specific migratory behavior on ACCX, characterized by quick migration/arrest cycles. It can be speculated that the cells explored the surface (quick migration phases) and deposited the matrix when they came into contact with other cells or apatite aggregates (migration arrest). Given that cells have numerous projections, the increased motility of osteoblastic cells on HA has been suspected in several studies. Nevertheless, no measurements of migration parameters have been performed (Ngiam et al., 2009; Zhu et al., 2006). A modified motility on mineralized substrates of mesenchymal stem cells has also been documented (Leonova et al., 2006). This specific migratory behavior explains how osteoblastic cells, as small as they can be on HA, could explore the entire area of the sample and homogeneously deposit the matrix. Furthermore,

VEGF is a strong inducer of osteoblast migration (Midy and Plouet, 1994), and it can be speculated that high levels of soluble and matrix-bound VEGF can play a determining role in MC3T3-E1 migration in the presented conditions.

Interestingly, pre-osteoblasts cultured on ACC revealed characteristics similar to those of osteoclasts: morphological adaptations (Saltel et al., 2004), as well as an increased adhesion (personal data) and activity (Destaing et al., 2005), observations that we could rely to the same mechanical niche (Discher et al., 2009) represented by collagen-mineralized substrates, that could affect bone cell general behavior and fate (Engler et al., 2006). Moreover, as VEGF is dose-dependently increased on mineralized collagen substrates, and possesses a pivotal role in angiogenesis-bone regeneration coupling (Schipani et al., 2009; Yu et al., 2009), ACCs provide an interesting model for coculture of osteoblastic cells, osteoclasts and endothelial cells in the study of bone remodeling in osteomimetic environments *in vitro*. Furthermore, the pre-osteoblastic matrix formed on ACCX seemed to mimic a cement line. A functionalized ACC material could be interesting in tissue engineering applications, favoring vascularization (increased VEGF-A), interface stability (increased OPN and FN) and biomaterial colonization (increased migration).

### **Conclusions:**

Altogether, the presented results have demonstrated that pre-osteoblasts in contact with mineralized collagen actively deposit signaling VEGF-A and RGD-containing proteins such as OPN and FN. Most probably, this specific surface activation is performed firstly to reinforce cell survival and adhesion and secondly to recruit and prepare surfaces for subsequent bone cell activity, roles that are physiologically attributed to cement lines.

**Acknowledgment:**

The authors wish to thank Karim Inoubli for his technical assistance during the videomicroscopy. This study has received financial support from the European Space Agency, European Research In Space and Terrestrial Osteoporosis (ERISTO) contract number 14232/NL/SH (CCN3) and Microgravity Application Programme AO-99-122 contract number 14426, as well as by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and the St-Etienne's institute for Science and Engineering IFR143-IFRESIS. AP held a research fellowship grant from La Region Rhone-Alpes.



### Principaux résultats/discussion de l'Article I:

La maîtrise des matériaux ACC, permet l'utilisation contrôlée de trois degrés de minéralisation (d.o.m.): 0% d'apatite complexé au collagène (ACC25), 25% d'apatite complexé au collagène (ACC25), 50% d'apatite complexée au collagène (ACC50).

<b>Morphologie cellulaire/biocompatibilité des matériaux</b>	<b>Expression génique et synthèse de protéines matricielles</b>	<b>Adhérence</b>	<b>Migration</b>
Cellules de plus en plus petites avec l'augmentation du d.o.m. avec maintien de la croissance cellulaire.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ↑ VEGF-A en fonction du d.o.m. (↑↑ VEGF-A soluble)</li> <li>- ↑↑ OPN</li> <li>- ↑ FN</li> <li>- ↑ intégrine β3 en fonction du d.o.m.</li> <li>- ↓ Coll I</li> </ul>	↑↑ en fonction du d.o.m. => implication des sites RGD	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ↑ vitesse</li> <li>- ↑ distance (en fonction du d.o.m.)</li> <li>- Profil caractéristique de migration en vague (alternance de phases d'exploration et de phases d'arrêt)</li> </ul>

Les pré-ostéoblastes exposés à des matériaux de collagène minéralisé augmentent avec le d.o.m leur activité de synthèse protéique, leur adhérence (liée aux sites RGD des protéines) et leur migration (en termes de vitesse et de distance), permettant une fonctionnalisation homogène du support de culture, malgré la diminution de la taille cellulaire observée avec le d.o.m.

Ces activités pourraient être effectuées pour protéger la cellule de l'apoptose (VEGF-A) dans un premier temps, puis pour recruter d'autres types cellulaires au lieu de fonctionnalisation, par l'intermédiaire du VEGF-A (molécule pro-migrante et angiogénique), de l'OPN et de la FN (sites d'adhérence privilégiés pour les cellules osseuses). Ces observations nous font ainsi penser que des pré-ostéoblastes cultivés sur des surfaces minéralisés synthétisent une matrice similaire à celle pouvant être trouvée dans les lignes cimentantes (riche en OPN et pauvre en Coll I). Par ailleurs, un parallèle peut être dressé entre les pré-ostéoblastes et les ostéoclastes

cultivés sur ACC, les deux types cellulaires augmentant leur activité et leur adhésion, tout en modifiant leur morphologie.

**Chapitre II. La décontraction cellulaire de cellules ostéoblastiques cultivées sur des supports ostéo-mimétiques stimule leur machinerie de mécanosensation (Papier II).**

*Article soumis à Bone.*

**Présentation de l'Article II:**

La capacité de fonctionnalisation des supports minéralisés par les pré-ostéoblastes pourrait provenir d'une modification initiale de la façon dont les cellules ostéoblastiques perçoivent ces supports de culture, que nous appellerons mécanosensation. En effet, les modifications morphologiques entraînées par les supports de collagène minéralisés pourraient engendrer des changements dans la mécanique intime de la cellule. Nous proposons ainsi que les augmentations d'activité des cellules ostéoblastiques par les supports minéralisés proviendraient d'une modification initiale de la capacité des cellules à percevoir leur micro-environnement, par activation de leur machinerie de mécanosensation/mécano-traduction.

**Article II:**

**Cellular relaxation of osteoblastic cells cultured on osteo-mimetic substrates stimulates their mechanosensing machinery**

Supprimé : stimulates

**A. Perrier<sup>a,b</sup>, M.T. Linossier<sup>a,b</sup>, C. Fournier<sup>a,b</sup>, V. Dumas<sup>a,b</sup>, M. Thomas<sup>a,b</sup>, P. Jurdic<sup>c</sup>, A. Rattner<sup>a,b</sup>, L. Vico<sup>a,b</sup>, A. Guignandon<sup>a,b</sup>**

<sup>a</sup>: Université de Lyon, F42023, Saint-Etienne France

<sup>b</sup>: INSERM U890, Laboratoire de Biologie du Tissu Osseux, IFR143, F42023 Saint-Etienne France

<sup>c</sup>: IGFL, Lyon France

**Abstract:**

Osteoblasts interact *in vivo* with collagen-containing matrices that differ in their mineral content. Mineralized substrates have been shown to increase osteoblast activities *in vitro*. The present article proposes that the morphological changes induced when osteoblastic cells are cultured on mineral substrates lead to an activation of the mechanosensing machinery, which could explain the widely known positive effects of apatite on these cells. MC3T3-E1 cells were seeded on collagen substrates complexed with various apatite contents and were compared to blebbistatin-treated MC3T3-E1 cells, given that mineralized substrates induced a cytoskeletal relaxation state. In both treatments, observations included a stress fiber disappearance, a microtubule persistence, cell projections, and enhanced focal adhesion (FA)-related gene expressions, i.e., genes implicated in mechanotransduction, as compared to fibrillar adhesion (FB)-related genes, implicated in cell adhesion. This FA/FB expression pattern was in agreement with the observed up-regulation of two particularly mechanosensitive genes in osteoblastic cells, osteopontin (OPN) and vascular endothelial growth factor (VEGF-A), on collagen-mineralized substrates. By means of vinculin transfection, it was demonstrated that the FA number and the turnover of osteoblastic cells were increased over time on collagen-mineralized substrates as compared to on a non-mineralized substrate. This could explain the observed enhancement in mechanotransduction, by reactivation of integrins.

**Key-words:** Apatite, osteoblastic cell, mechanotransduction, focal adhesion, clutch

**Introduction:**

During bone remodeling, bone cells interact with collagen matrices with varying degrees of mineralization (Boivin and Meunier, 2002). The mineral of bone, i.e., apatite, has been shown to induce morphological alterations in osteoblastic cells (Chou et al., 2005b; Richard et al., 2006; Xu et al., 2008). The continual feedback between cell shape and mechanosensing (Vogel and Sheetz, 2006) may explain the positive effect of apatite on the osteoblast activity (Moursi et al., 2002; Thian et al., 2006).

The mechanosensing apparatus has been attributed to the cytoskeleton and integrins which transmit external forces in the cell by a process known as mechanotransduction (Ingber, 2006). However, recent findings have exposed that a round cellular morphology, supporting a less stiff cytoskeleton, is more mechanosensitive than a flat cellular morphology, supporting a stiffer cytoskeleton (Bacabac et al., 2008). This interesting observation has led to the hypothesis that the dynamics of integrins, their localization and/or activation may be different when the cells present a soft cytoskeleton.

Integrins are transmembrane heterodimeric cell surface receptors present in adherent cells such as osteoblasts. They recognize specific ligands of the extracellular matrix (Takagi, 2007), forming a link between the cell and its environment in subcellular frameworks known as adhesion complexes. This permits adhesion and probing of the environment (Geiger and Bershadsky, 2002). A variety of adhesion complexes have been described, according to their maturation stage, making their molecular content change (Cukierman et al., 2001). Focal complexes are nascent cellular adhesions that evolve in focal adhesions (FAs), ultimately growing in fibrillar adhesions (FBs) (Zaidel-Bar et al., 2004). It has been recognized that FAs, localized at the cell leading edge (von Wichert et al., 2003), are implicated in mechanotransduction (Shemesh et al., 2005), making them grow from focal complexes (Riveline et al., 2001). It has also recently been demonstrated that the  $\alpha$ V $\beta$ 3 integrin, a specific integrin of FA<sub>2</sub>, was responsible for adhesion reinforcement and mechanotransduction and that the  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin, a more specific integrin of FB<sub>2</sub>, was responsible for adhesion strength (Roca-Cusachs et al., 2009).

The motivation behind the present study was to determine whether there exists a link between osteoblastic cell morphology alterations on mineral substrates with varying degrees of apatite

content, and their mechanotransduction potential following their FA/FB ratio. This was investigated by way of the expression of specific integrins and the expression of mechanosensitive genes, such as fibronectin (FN) (Dumas et al., 2009; Faure et al., 2008), osteopontin (OPN) (Kubota et al., 1993; Morinobu et al., 2003), and vascular endothelial growth factor (VEGF-A) (Thi et al., 2007).

Supprimé : that of

Supprimé : ir

Osteoblastic cells were plated on collagen-mineralized substrates denoted ACC (Apatite Collagen Complex) (Saltel et al., 2004; Shibutani et al., 2000) and quantifications by RT-PCR were carried out of the expression of the  $\beta$ 1 integrin subunit and its preferential ligand, type I collagen (Coll I), representative of FB, on the one hand, and the  $\beta$ 3 integrin subunit and its preferential ligand, osteopontin (OPN), representative of FA, on the other hand. A preferential increase in FA-related genes on the mineralized substrates was found and this increase was linked to the fact that the cytoskeleton was relaxed, given that blebbistatin-treated cells also put the balance in favor of mechanosensing machinery-related genes. As a result of the enhanced mechanosensitivity, mechanosensitive genes were stimulated on collagen-mineralized substrates. Furthermore, a time-lapse recording of vinculin-transfected cells showed that FAs were highly dynamic on these substrates. Increased mechanosensitive gene expressions under such conditions led to ACCs being proposed as mechanomimetic materials.

## **Materials and Methods:**

### Reagents and antibodies:

35-mm culture-treated dishes were obtained from Falcon. Rabbit anti-MLC2 antibody was purchased from Cell Signalling Technologies (Ozyme). Goat anti-rabbit alexa fluor 488 antibody and rhodamine-phalloidin was received from Invitrogen. All other reagents were purchased from Sigma.

### Apatite Collagen Complexes (ACCs):

ACCs were prepared by carrying out slight modifications to a previously described method (Shibutani et al., 2000). Briefly, 35-mm cell culture-treated dishes (TCPS) were coated with a calf skin type I collagen solution overnight at room temperature. The dishes were then immersed in various baths based on Tris-Buffered Saline (TBS), pH=8.5. The first bath contained alkaline phosphatase and egg yolk phosphitin (0.13 mg/ml) at 37°C, and the second comprised calcium  $\beta$ -glycerophosphate (6 mM) at 37°C. The dishes were finally washed with water and the ACCs were dried and stored at 4°C before use. The successive immersions induced the deposition of an apatite-mimicking bone mineral on the plates (Doi et al., 1996; Shibutani et al., 2000), and the duration of the successive incubations determined the amount of apatite mixed with the collagen.

The choice was made to study three d.o.m., ranging from 0 (pure collagen coating=ACC0) to 50% apatite complexed with collagen. By varying the durations of the first and second baths, it was possible to control the amount of apatite mixed with collagen. A 3-10h cycle provided an ACC where 25% of the collagen surface was mixed with apatite, hereafter denoted ACC25. A 3-20h cycle, repeated twice, provided an ACC where 50% of the collagen surface was mixed with apatite, hereafter named ACC50. A quantification method for determining what percentage of the area that was covered with apatite has been described elsewhere (Perrier et al., 2010). In the following, the designation ACCX is used when referring to either ACC25 or ACC50. TCPS was employed as a control substrate.

### Cell culture:

The MC3T3-E1 pre-osteoblastic cell line derived from C57BL/6 mouse calvaria was obtained from ATCC (CRL-2593). MC3T3-E1 cells (within passage 18) were maintained in T75 flasks in  $\alpha$ MEM supplemented with 10% fetal calf serum (ATGC Biotechnologies, Marne-la-Vallée, France, batch 916996), 2 mM L-glutamine and antibiotics (50 U/ml penicillin, 50  $\mu$ g/ml streptomycin) in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

Cells in T75 were rinsed with citrate buffer, trypsinized upon subconfluence using 1X trypsin-EDTA and seeded in 2 ml of the medium used for the cell maintenance. Cell seeding was normalized to  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>, on TCPS, ACC0, ACC25 and ACC50, to reach an identical cell number regardless of the substrate, 32h after seeding.

### RNA extraction and RT-PCR:

To isolate the total RNA for quantitative RT-PCR, the samples underwent lysis with the Trizol buffer (Roche, Hague Road, Indianapolis). The cell lysate was transferred to QiaShredder (Qiagen, Inc., Valencia, CA) columns for RNA purification. RNase-Free DNase (Roche) was used to eliminate DNA contamination of the RNA samples. Purified RNA was dissolved in RNase-free water and its concentration was assessed at 260 nm. The RNA quality was verified on a 2% agarose gel with 1  $\mu$ g/ml ethidium bromide. Samples were stored at -80°C until use. Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 2  $\mu$ g of total RNA with the 1st strand cDNA synthesis Kit for RT-PCR (AMV, Roche, Hague Road, Indianapolis).

8  $\mu$ l of a cDNA mixture diluted at a ratio of 1:20 in water was subjected to real-time PCR using SYBR Green I dye (Lightcycler faststart DNA master SYBR green I, Roche, Penzberg, Germany). Reactions were performed in a 20- $\mu$ l PCR mixture containing 4  $\mu$ l 5x Master Mix (dNTP mixture with dUTP instead of dTTP, MgCl<sub>2</sub>, SYBR Green I dye, Taq DNA Polymerase and reaction buffer), 2  $\mu$ l of 10- $\mu$ M primers. The primer sequences of osteopontin (OPN),  $\alpha$ 1 procollagen (Coll I),  $\beta$ 3 integrin ( $\beta$ 3) and  $\beta$ 1 integrin ( $\beta$ 1), fibronectin (FN) and vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) are listed in Table 1. Cyclophilin was used as a control. Standard curves were obtained from 10-fold dilutions of the total RNA from an RNA sample extracted from MC3T3-E1 cell cultures. Amplified products were



examined for size estimation on a 2% agarose gel with 1 µg/ml ethidium bromide and DNA molecular weight markers. The results were expressed as the increase in fold of gene expression on TCPS, after normalization based on cyclophilin values.

#### Actin, microtubules and myosin light chain (MLC2) staining:

The samples were rinsed in PBS, fixed with 4% formalin for 30\_min at room temperature and permeabilized with 0.1% Triton X100 for 3\_min at ambient temperature. The samples were then incubated with rhodamine-phalloidin (1:30 diluted), mouse anti β-tulin Cy3 antibody (1:50 diluted) in order to label actin and microtules, respectively. They were subsequently rinsed with PBS and switched to a mounting medium before being examined with a Leitz DMRB fluorescence microscope.

MLC2 staining was performed using a previously described method (Bhadriraju et al., 2007) that was slightly modified. Briefly, the samples were rinsed in PBS, fixed in 4% formalin containing 0.5% Triton X100 during 20\_min at ambient temperature. Subsequently, they were rinsed twice with PBS and twice with Tris-buffered saline (TBS) before being incubated with rabbit polyclonal anti diphospho MLC2 antibody (1:50 diluted). After an overnight incubation at 4°C, the samples were rinsed several times with PBS containing 0.05% Triton X100 (PBSTX), after which secondary goat anti-rabbit antibody alexa fluor 488 (1:250 diluted) was added for 1h at 37°C. Finally, the samples were rinsed several times with PBSTX and switched to a mounting medium before being examined with a Leitz DMRB fluorescence microscope.

All images were acquired with a Roper Scientific CoolSnapfx camera using the Meta Imaging series 4.6.6. software. The MLC2 staining distribution was subsequently measured using the ImageJ software.

#### Fibronectin and nucleus staining:

The samples were rinsed in PBS, fixed with 4% formalin for 30 min at room temperature and incubated with rabbit anti-human fibronectin (1:100 diluted) for 2h at 37°C. This was followed by an incubation with goat anti-rabbit alexa fluor 488 (1:250 diluted) for 1h at 37°C. For nuclei labeling, the samples were incubated with 1-µg/ml DAPI for 1h at 37°C.

Blebbistatin treatment:

The MC3T3-E1 cell medium was aspirated 5h after seeding, when the cells had attached their substrate, and was replaced with  $\alpha$ MEM containing 50- $\mu$ M blebbistatin, during 27h. Subsequently, 32h post seeding, cell lysates for RT-PCR were obtained.

Vinculin transfection:

MC3T3-E1 cells were seeded in 6-well plates at  $2 \times 10^5$  cells per well for 24 h in complete medium. pTagRFP-vinculin, EVROGEN, was mixed (1:2 ratio) with Jet Prime solution used for transfection in order to obtain 1  $\mu$ g DNA and 2  $\mu$ l of JetPrime per well. The cells were then incubated with the mixed solution for 10 min at ambient temperature. The total transfection time was 24 h, after which the cells were transferred to the ACCX materials for time-lapse imaging and quantification.

Image analyses:

Image analyses were performed with the ImageJ free software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) in order to determine the percentage of mineral mixed with collagen and to characterize the distribution pattern of MLC2. All analyses were performed after background removal and thresholding of the image. To determine the MLC2 distribution throughout the cells, analysis was performed on approx. 20 cells (400 $\times$  magnification) of each substrate condition. The cells were manually delineated and a mask was created. A distance map was obtained with this mask, and multiplication of the distance map by the MLC2 fluorescent image provided the distribution from the cell edge to the center of the MLC2 fluorescence. The mean distance for each cell was statistically compared, and a decreased distance of fluorescence from the cell edge indicated that fluorescent structures were more peripheral.

Concerning the morphological parameters obtained using RFP-vinculin expressing cells, a previously published technique was employed (Usson et al., 1997). This rendered possible the calculation of the vinculin number, area per cell. As for the dynamics of the vinculin positive contacts, time-lapse recording was employed: by overlaying all of the time points, the cumulative number and area of vinculin positive contacts could be calculated. In order to

estimate the turn-over of contacts, 4 to 5 large contacts per cell were manually selected close to the cell edge and were then tracked from clustering to dispersion. Finally, a statistical comparison was made of these durations. A time lapse of 2 hours was used to perform such measurements (one image every 2 minutes) and a total of 20 cells per condition were used.

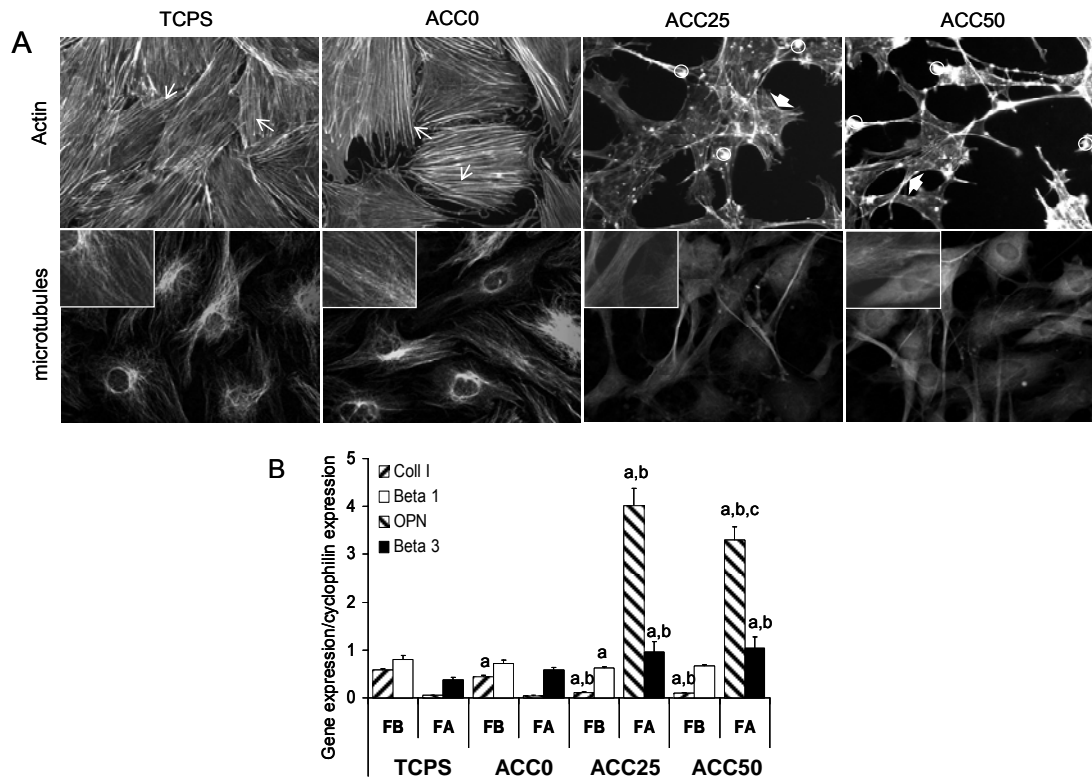
Statistical analyses:

Statistical analyses were performed with the STATISTICA7.1 software (Statsoft Inc). All data was explored by one-way analysis of variance (ANOVA). When F-values for a given variable were found to be significant, a comparison among individual samples was assessed by the post-hoc method of Fisher. Results were considered to differ significantly when  $p < 0.05$ . All data is presented as mean  $\pm$  SEM.

**Results:**Cell morphology and FA/FB related gene expressions on collagen mineralized substrates:

Dramatic morphological modifications of the cytoskeleton were seen when cells were seeded on collagen-mineralized substrates (Fig. 1A). 32 hours after seeding, actin microfilaments were found to be classically arranged in stress fibers on TCPS and ACC0, whereas for ACCX, cytoplasmic extensions were observed with actin stress fiber disappearance. However, actin spots and cortical actin persistence were noted on these substrates (Fig. 1A). Microtubules were present regardless of the substrate, but since the cells were dose-dependently smaller on ACC25 and ACC50, the microtubule network appeared to be collapsed (Fig 1A).

Screening was performed of two categories of adhesive contact genes: fibrillar adhesion (FB)- related genes, implicated in cell adhesion, and focal adhesion (FA)- related genes, implicated in cell mechanotransduction (Roca-Cusachs et al., 2009). The FB category included type-I collagen (Coll I) and  $\beta 1$  integrin genes and FA comprised osteopontin (OPN) and  $\beta 3$  integrin genes. When the levels of expression of FA- or FB-related genes were compared between unmineralized substrates (i.e., TCPS and ACC0), 32 hours after seeding, only a significance for Coll I expression was seen (0.75-fold on ACC0 vs. TCPS). Furthermore, the FA- and FB- related genes were expressed at the same level on both unmineralized substrates. On mineralized substrates, on the other hand, there occurred a down-regulation of FB-related genes, illustrated by the Coll I expression (0.19-fold and 0.16-fold on respectively ACC25 and ACC50 vs. TCPS) and the  $\beta 1$  integrin expression on ACC25 (0.78-fold vs. TCPS). There was also a dramatic up-regulation of FA-related genes on these substrates, with respectively an 80-fold and 65-fold increase in OPN expression on ACC25 and ACC50 vs. TCPS. The  $\beta 3$  integrin was also up-regulated 2.5-fold on ACCX vs. TCPS. This led to a balance clearly in favor of FA-related genes on both mineralized substrates (Fig. 1B).



**Figure 1:** The cell morphology as well as the FA- and FB-related gene expressions on collagen-mineralized substrates, 32 hours after seeding. (A) Morphological changes of actin and microtubules on the different substrates (the inserts represent image magnifications). (Thin arrows: stress fibers. Large arrows: actin staining on cell edge. Circles: actin spots. The representative images have been magnified 400x.) (B) Gene expressions in terms of fibrillar adhesion (FB)-related genes and focal adhesion (FA)-related genes on the substrates (mean  $\pm$  SEM, a: difference vs. TCPS, b: difference vs. ACC0, c: difference vs. ACC25,  $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ).

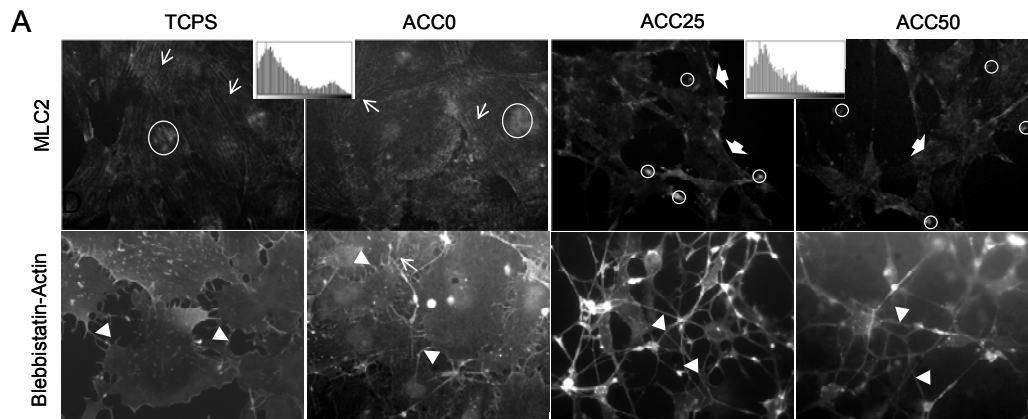
Mechanotransduction gene expression modulation by cell relaxation:

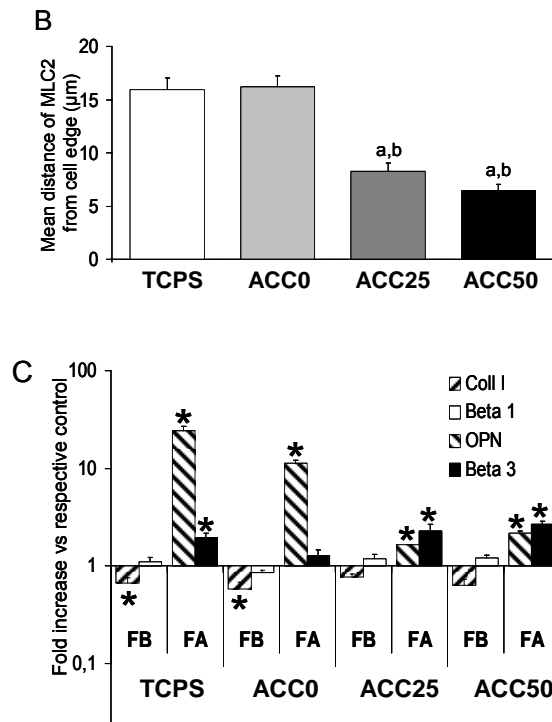
As stress fibers were absent on ACCX, it was deemed of interest to determine how the contractile agent myosin was modulated. This was done by staining the phosphorylation of its regulatory light chain. Phosphorylated Myosin Light Chain 2 (MLC2) was organized in fiber structures on TCPS and ACC0, along the actin microfilaments. A subnuclear MLC2 location could be noted on these substrates (Fig. 2A). On ACC25 and ACC50, only MLC2 spots were seen, with a preferential peripheral distribution, denoted by MLC2 distribution profiles (Fig. 2A). The objective was to compare these morphological changes with a referent myosin inhibiting agent, i.e., blebbistatin. As expected, the blebbistatin treatment induced the disappearance of stress fibers regardless of the substrate. Furthermore, cell extensions appeared, and the longest ones were seen on the mineralized substrates (Fig. 2A).

As expected, a decrease in the mean distance of MLC2 from the cell edge was observed on mineralized collagen substrates (Fig. 2B). This demonstrated the peripheralization of the cell contractile apparatus.

Treating osteoblastic cells with blebbistatin induced the same preferential gene expression as that seen on collagen-mineralized substrates, in favor of FA-related genes, 32 hours after seeding and regardless of the substrate (Fig. 2C). FB-related genes were either insensitive to the blebbistatin treatment or slightly down-regulated, as demonstrated by the Coll I expression on TCPS and ACC0 (respectively 0.66-fold and 0.58-fold vs. their untreated counterparts). FA-related genes were dramatically up-regulated by the blebbistatin treatment, regardless of the substrate. Indeed, the OPN expression was increased 24-fold, 11-fold, 1.7-fold, and 2-fold on respectively treated TCPS, ACC0, ACC25 and ACC50 vs. untreated controls. Moreover, the  $\beta$ 3 integrin expression was increased 2-fold and 2.5-fold on respectively TCPS and ACCX vs. untreated controls.

Since the FA-related genes that were implicated in mechanotransduction were dramatically increased by cell relaxation (ACCX or blebbistatin), attempts were made to verify how mechanoresponsive genes were modulated when osteoblastic cells were cultured on collagen-mineralized substrates. Furthermore, FA was quantized by way of vinculin-positive contacts.





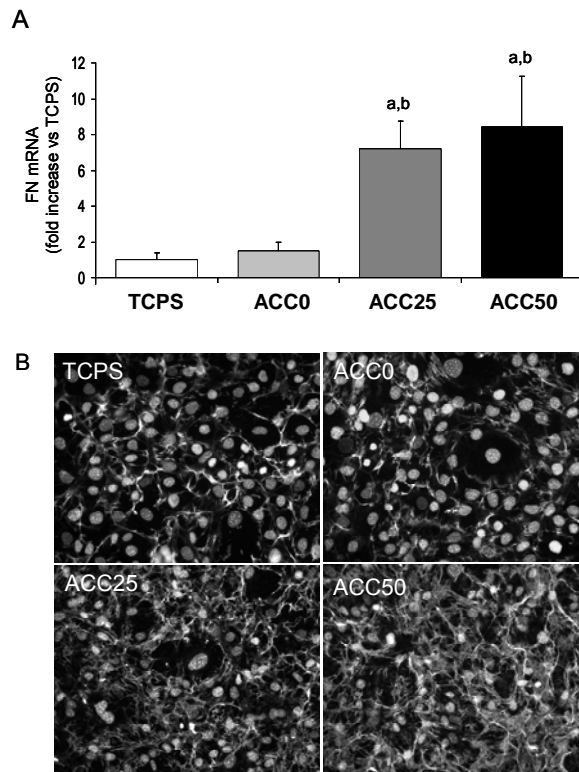
**Figure 2:** The modulation of mechanotransduction gene expressions by cell relaxation, 32 hours after seeding. (A) Regulatory myosin light chain (MLC2) staining (the inserts represent the MLC2 distribution profiles throughout the cell; the same distribution profile was found for TCPS/ACC0 and ACC25/ACC50) and actin changes after blebbistatin treatment. (Thin arrows: stress fibers. Large arrows: MLC2 staining on cell edge. Arrowhead: filopodia. Small circles: MLC2 spots. Large circles: subnuclear MLC2 staining. The representative images have been magnified 400×). (B) Quantification of the MLC2 mean distance from the cell edge on the different substrates. (C) Blebbistatin relaxed state induced gene expressions in terms of fibrillar adhesion (FB)-related genes and focal adhesion (FA)-related genes on the substrates, 32 hours after seeding (mean ± SEM, a: difference vs. TCPS, b: difference vs. ACC0, \*: difference vs. corresponding non-treated substrates, p<0.05, n=20 for MLC2 quantification and n=5 for gene expression balance).

Fibronectin expression and deposition:

FN mRNA was increased on ACCX with a 7-fold and 8-fold expression on respectively ACC25 and ACC50 vs. TCPS (Fig. 3A), 32 hours after seeding. Fibronectin immunostaining confirmed the increased fibronectin expression, 72 hours after seeding, with more fibronectin deposited on the mineralized substrates. The cell number was the same as attested by DAPI staining (Fig. 3B).

Supprimé : here

Supprimé : that

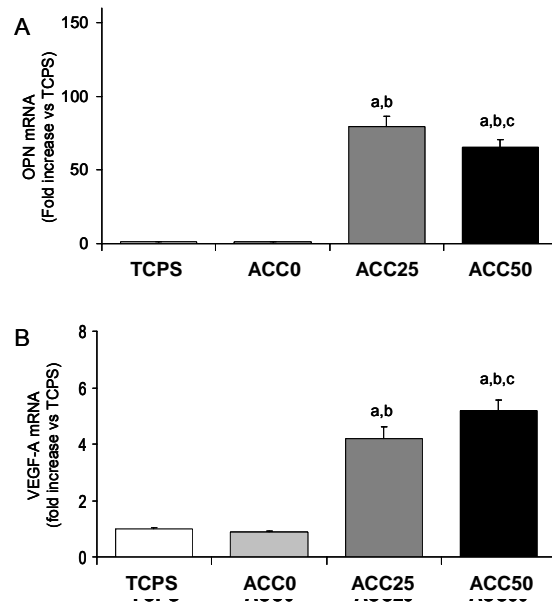


**Figure 3:** Fibronectin expression and deposition. (A) FN mRNA quantified by RT-PCR, 32 hours after seeding, and (B) 200× magnification of representative FN immunostaining with respective nucleus staining, 72 hours post seeding (mean ± SEM, a: difference vs TCPS, b: difference vs. ACC0,  $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ).

Osteoblastic mechano-representative gene modulations induced by the substrates:

OPN mRNA was dramatically up-regulated on mineralized substrates with a 80-fold and 65-fold expression on respectively ACC25 and ACC50 vs. TCPS (Fig. 4A). Furthermore, VEGF-A mRNA was dose-dependently up-regulated with the substrate mineral content, with a 4-fold and 5-fold expression on respectively ACC25 and ACC50 vs. TCPS (Fig. 4B).





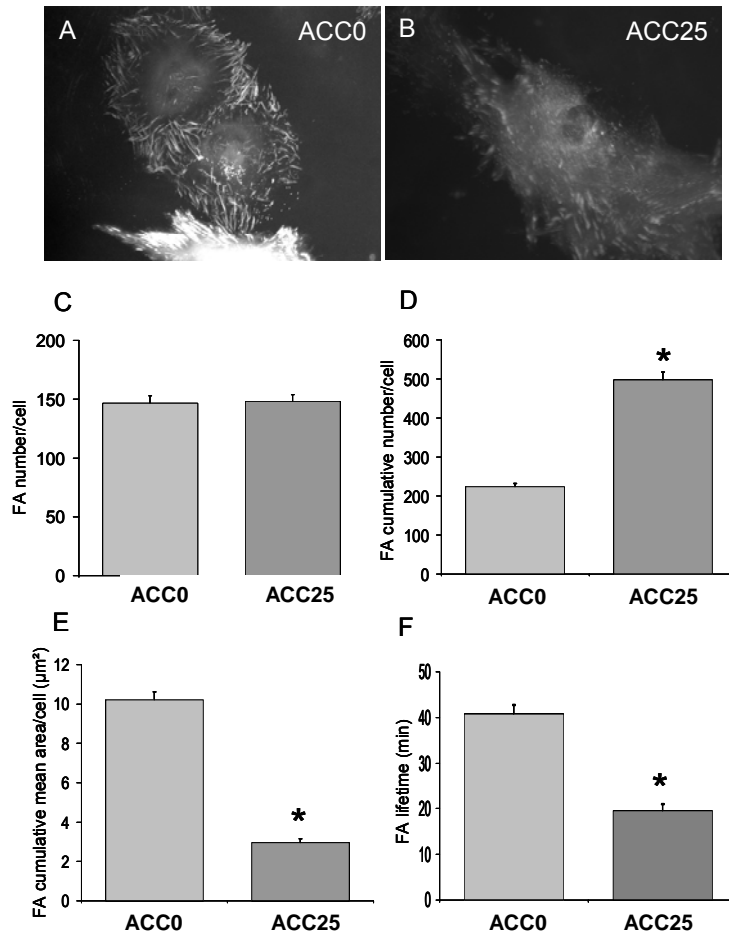
**Figure 4:** Osteoblastic mechano-representative gene modulations induced by the substrates. (A) OPN and (B) VEGF-A expressions, 32 hours after seeding (mean  $\pm$  SEM, a: difference vs. TCPS, b: difference vs. ACC0, c: difference vs. ACC25,  $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ).

#### Dependence of vinculin dynamics on the mineralization state of the substrate:

The presented images have illustrated vinculin transfected cells over a two-hour period after 32 hours of seeding on an unmineralized and a mineralized collagen substrate. By overlaying all images of a two-hour time lapse, very long vinculin comets could easily be observed on ACC0 (Fig. 5A). This was in contrast to the presence of numerous small spots on ACC25 (Fig. 5B). Regardless of the particular timing considered in the time lapses, image analyses revealed ed that the vinculin number/cell was virtually the same for a collagen-coated substrate and a collagen-mineralized substrate ( $146.62 \pm 6.21$  and  $148.11 \pm 5.73$  for ACC0 and ACC25, respectively) (Fig. 5C).

By contrast, when the same quantification was performed on overlaid images for all the time points, it was observed that the collagen-mineralized substrate contained ed more than 2-fold FA as opposed to the collagen-coated substrate ( $223.69 \pm 7.86$  and  $498.48 \pm 20.09$  for ACC0 and ACC25, respectively), thus reflecting an increased remodeling (Fig. 5D). It was further demonstrated that the cumulative vinculin mean area was smaller on a collagen-mineralized substrate as opposed to on its collagen-coated analog ( $10.21 \pm 0.42$  and  $2.96 \pm 0.20$  for ACC0

and ACC25, respectively) (Fig. 5E). In complete accordance with [this](#) data, [the](#) FA lifetime was [found to](#) decrease on a mineralized substrate [as opposed to on a](#) collagen-coated substrate ( $40.85 \pm 4.89$  min and  $19.58 \pm 3.51$  min for ACC0 and ACC25, respectively) (Fig. 5F).



**Figure 5:** [Dependence of vinculin dynamics](#) on the mineralization state of the substrate. RFP-vinculin transfected cells were imaged during a 2-hour recording session after 32 hours of seeding. Overlaid images are presented on (A) a non-mineralized collagen substrate (ACC0) and (B) a mineralized substrate (ACC25). [The representative overlaid images were magnified 400 \$\times\$ .](#) [A comparison of vinculin-positive contacts \(FA\) numbers;](#) (C) at a given point [in time of the recording,](#) and (D) on overlaid images. (E) [A comparison of vinculin-positive contact \(FA\) areas on overlaid images.](#) (F) [A comparison of the FA lifetime \(mean  \$\pm\$  SEM. \\*: difference vs. ACC0,  \$p < 0.05\$ ,  \$n = 20\$ \).](#)

**Discussion:**

The question that was put forward was whether the mechanosensing machinery of osteoblastic cells could be modulated when cultured on collagen-mineralized substrates (ACCX). Cytoskeletal tension has been largely demonstrated to be a prerequisite for force sensing and response (Colombelli et al., 2009; Ingber, 2003b), and mechanical stress has been shown to increase cytoskeletal tension (Albinsson et al., 2004; Yoshigi et al., 2005). More precisely, osteoblasts have been found to release their local tension in order to reorganize their cytoskeleton and respond to external cues (Sato et al., 2005).

In apparent contradiction with this data, cell relaxation has in different studies been reported to induce a greater cell response to mechanical stimulation than tensed cells (Bacabac et al., 2008; Ghosh et al., 2008; Zhang et al., 2006a), thus demonstrating that a cell relaxed state can also allow force sensing. Here, it was found that ACCX induced the disappearance of actin stress fibers but led to the contractile apparatus (actin and myosin) being maintained at the cell periphery. This can be compared to the well-developed stress fibers containing MLC2 in the entire cell on TCPS and ACC0. Actin and MLC2 spots observed on ACCX led to the speculation that, at a given time, there was a localized spatial distribution of the contractile apparatus inside the cell body, probably in order to maintain the minimal inner tension required for basic cell activities (Clark et al., 2007). However, the microtubule network persisted throughout the cell and cellular projections were noticed on these mineralized substrates, in accordance with previous investigations (Chou et al., 2005b; Xu et al., 2008).

Interestingly, it has already been described that a relaxed cytoskeleton state induces cell projections, linked to the persistence of the microtubule network (Goldberg and Burmeister, 1992; Rhee et al., 2007). Such behaviors have been explained by the clutch hypothesis (Rhee and Grinnell, 2007). This theory involves the actin retrograde flow being blocked with respect to the substrate (i.e., a clutch is engaged), allowing actin polymerization and protrusion formation at the cell leading edge. In a high tension state, cells present stress fibers and an external clutch engaged by integrins. On the other hand, when cells are in a low tension state, they become relaxed and the clutch is internal, engaged by microtubules. This latter description was in agreement with the present conditions of stress fiber disappearance and microtubule persistence on ACCX, with the presence of long cell projections.

Blebbistatin, known to inhibit myosin (Kovacs et al., 2004), has been shown to promote microtubule expansion (Even-Ram et al., 2007) and a blebbistatin treatment generally induces microtubule-dependent protrusions (Rhee et al., 2007; Ryu et al., 2006), as was observed under the conditions of the present study. Hence, the blebbistatin treatment morphologically resumed osteoblast behavior on the mineral, which was characterized by a relaxed cytoskeleton state and numerous thin cell projections. Since these projections have been postulated to be specialized structures sensing the cell environment (Dalby et al., 2004; Yamada et al., 1970), an enhancement of environmental detection could be suspected on mineralized substrates or after blebbistatin treatment.

Indeed, it was demonstrated that mechanotransduction-related genes, i.e., genes of the FA (Roca-Cusachs et al., 2009; Shemesh et al., 2005), were enhanced when the cell tension became relaxed, either by the mineralized substrate or blebbistatin. Adhesion-related genes, i.e., genes of the FB, were reduced or unaltered by both treatments. One can notice that the blebbistatin-induced increase in FA-related genes was less significant on ACCX as opposed to on unmineralized substrates, however should be aware that the FA-related gene inductions on ACCX were already dramatic, which led to the final inductions also being dramatic. Furthermore,  $\beta$ 3 integrins, which formed the link between the cell and the extracellular matrix in FA, have been localized at cell edges (von Wichert et al., 2003), where the contractile apparatus persisted under the presented conditions, thus allowing signal transmission (Ingber, 2003b). Numerous examples have demonstrated that transduction occurs locally, at the cell periphery, even though the forces propagate throughout the cell (Choquet et al., 1997; Riveline et al., 2001; von Wichert et al., 2003). This places the peripheralized contractile apparatus on ACCX in an ideal location for mechanotransduction purposes.

FN fibrillogenesis is a process that begins at the cell periphery (Geiger et al., 2001; Pankov et al., 2000), and the maintenance of a force gradient rendered it possible for the cells to synthesize the extracellular matrix (Lemmon et al., 2009). Consequently, FN synthesis could be permitted on ACCX and the increased deposition could be explained by the 3D characteristic of ACCX, since an enhanced FN synthesis on three-dimensional substrates was reported (Mao and Schwarzbauer, 2005b). It has been pointed out that osteoblasts respond better to their mechanical environment when they are seeded on fibronectin surfaces, due to an enhanced integrin engagement (Ponik and Pavalko, 2004; Takai et al., 2006).

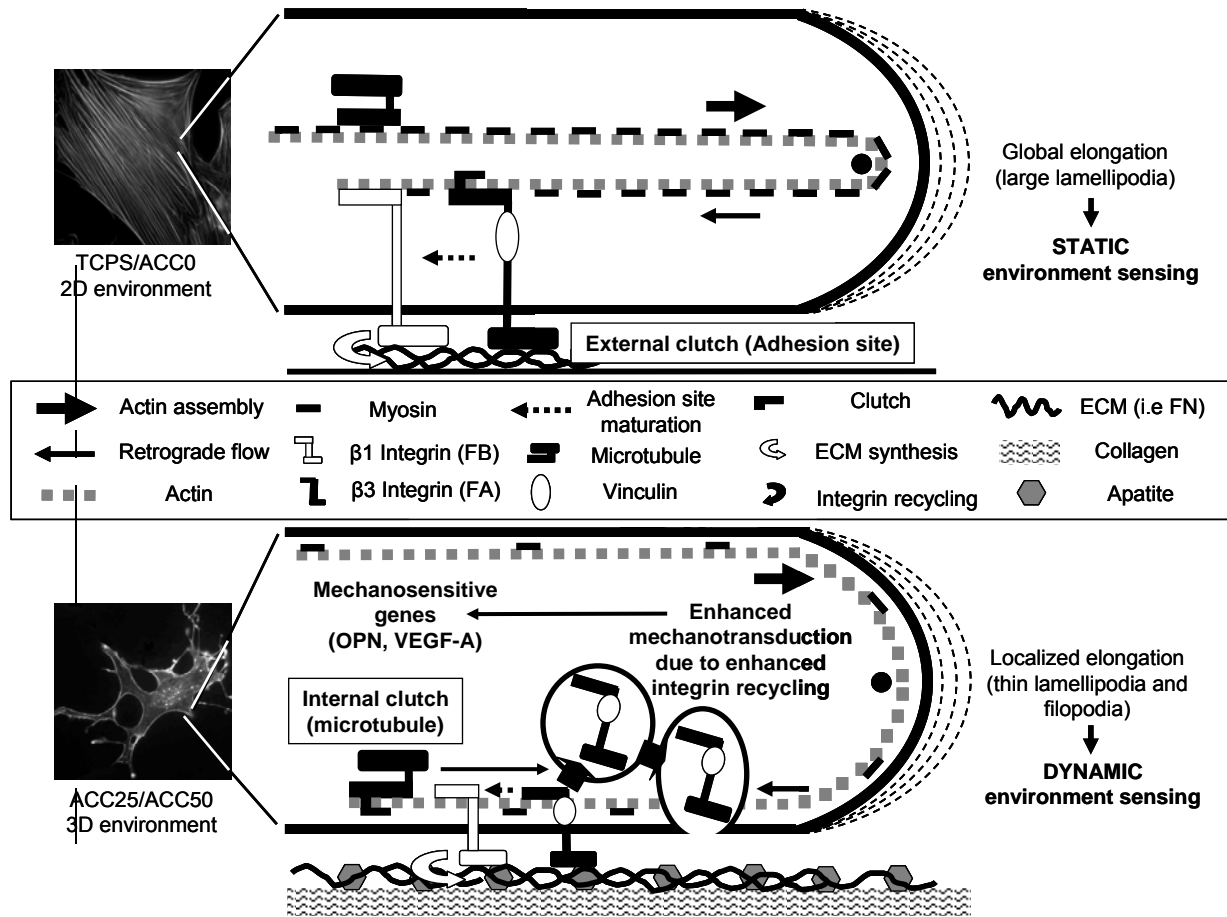
As a result of increased mechanotransduction, genes that respond specifically to mechanical challenges in osteoblastic cells, such as OPN (Kubota et al., 1993; Morinobu et al., 2003) or VEGF-A (Thi et al., 2007), would be affected on ACCX. Indeed, a dramatic increase of OPN mRNA on ACCX was observed. OPN thus represents a perfect example of the fact that the first step of mechanotransduction may be the synthesis of mechanotransducers (FA). VEGF-A mRNA, as a mechanosensitive gene, was dose-dependently enhanced on ACCX, possibly indicating that more mechanical information could be sensed/extracted as the collagen mineral content increased. More specifically, one can hypothesize that the cells increased their mechanoresponse by way of FA dynamics, represented by vinculin (an FA member) dynamics. If we accept that mechanosensing/probing is related to mechanosensor dynamics, an increase in the FA dynamic/turnover can be associated with an improved mechanosensing ability. It was found that the number of vinculin-transfected FA increased on a mineralized substrate in a given period of time (in accordance with an increased  $\beta$ 3 integrin expression) even if the same number of vinculin-transfected FA was found, at a given time point. Such an increased formation of FA would allow an enhanced environment probing. At the same time, the smaller FA observed on vinculin-transfected cells cultured on a mineralized substrate showed that adhesion dynamics, in this condition, did not allow cells to fully enlarge their contacts. Rather, it forced the recycling of these contacts. Indeed, the cytoskeletal instability on a mineralized substrate was associated with a higher FA turnover, which could give rise to an enhanced mechanosensing/probing of the substratum, by resensitization of the integrins.

The above-mentioned clutch has already been demonstrated to inherently sense and respond to local environment (Chan and Odde, 2008; Wang, 2007). Based on this theory, the present study proposes that, when cells are plated on TCPS or ACC0, large lamellipodia are formed due to integrin clusterization and FAs are predominantly static (high vinculin lifetime), giving rise to a basal mechanotransduction. However, when cells are seeded on ACCX, microtubules constitute an internal clutch and thin lamellipodia and filopodia-like protrusions are formed due to a localized elongation of the cell membrane. In this condition, integrins (and by extension FAs) are released from the clutch, allowing them to rapidly recycle (reduced lifetime); a fact that may allow them to fulfil their roles as mechanotransducers (Ingber, 2006; Roca-Cusachs et al., 2009; Shemesh et al., 2005). In fact, in this condition, a microtubule-mediated FA integrin endocytosis was expected, as also recently demonstrated (Ezratty et al., 2009).

To simplify, the mechanosensing ability may be more accurately linked with release/recycling of FAs than with the establishment of large static complexes. A rapid recycling of FAs may be associated with the maturation of reduced adhesion complexes into FBs (Zaidel-Bar et al., 2004). Nevertheless, FN accumulated significantly on ACCX, indicating that a high FA turnover was not associated with immaturity of the adhesion complexes. On the contrary, a rapid maturation of FA into FB may be the triggering signal for the recycling of vinculin-positive adhesion complexes, and this assumption could also explain why more FN was deposited on ACCX. In a tentative to summarize the osteoblast behavior on ACCX, we propose a model that considers the clutch localization, FA recycling and fibronectin synthesis (Fig. 6).

Interestingly, blebbistatin-treated osteoblastic cells cultured on mineralized substrates show a morphological resemblance to osteocytes, i.e., the putative specialized mechanical sensing cells in bone (Burger and Klein-Nulend, 1999). The specialized dendritic morphology of these cells (Sugawara et al., 2005) has recently been described to better sense mechanical challenges than the cell body (Adachi et al., 2009).  $\beta 3$  integrins, that are widely expressed in osteocytes (Bennett et al., 2001), have been determined important in this process (Miyachi et al., 2006). Moreover, the contractile apparatus has been shown to be located in osteocyte processes (Murshid et al., 2007), a strategic position to mediate physical deformations of the plasma membrane (Tanaka-Kamioka et al., 1998). Further studies are needed to characterize our cell phenotype under these conditions.

In summary, mineralized collagen substrates induced a delocalization of the contractile apparatus at the cell edges. Moreover, they also caused cell projections and upregulated their expression of FA-related genes (that were implicated in mechanotransduction). As the same behavior was observed when cell tension was abolished, it is believed that osteoblastic cells on mineral substrates modified the repartition of their tension and induced cell projections to probe their environment, thus enhancing their mechanotransduction abilities. Since the FA turnover and maturation, as well as the genes responding to mechanical challenges, were increased, ACC is proposed as a mechanomimetic material.



**Figure 6:** Clutch theory and mechanotransduction (adapted from (Rhee and Grinnell, 2007)). When the cells were plated on TCPS or ACC0 (upper panel), an actin flow occurred. When the retrograde actin flow was blocked by integrins (forming a framework in adhesion clusters, comprising vinculin) – the external clutch – actin and myosin motors pushed forward the cell membrane in adjacent areas and large lamellipodiae formed. This activity led to the creation of actin stress fibers inside the cell body. In this condition, the FAs were static since the integrins were entrapped in the clutch, providing a basal environment sensing. When the cells were plated on mineralized substrates (lower panel), the peripheral retrograde actin flow became blocked by microtubules defining an internal clutch. Thin filopodia-like protrusions were formed by localized elongation of the cell membrane due to the actin assembly. It is proposed that extending filopodia promoted environment sensing, since integrins, which were released from the clutch, rapidly became recycled due to microtubule presence. This provided a dynamic environment sensing that stimulated the cell mechanotransduction machinery, terminally inducing mechanosensitive gene expressions. In both conditions, FA could mature into FB due to tension maintenance in the whole cell (TCPS/ACC0) or at the cell periphery (ACC25/ACC50). The latter condition rendered it possible to sustain greater FN fibrillogenesis (see discussion for details).

**Acknowledgments:**

This study has received financial support from the European Space Agency, European Research In Space and Terrestrial Osteoporosis (ERISTO) contract number 14232/NL/SH (CCN3) and the Microgravity Application Programme AO-99-122 contract number 14426. Further funding has been provided by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and the St-Etienne's institute for Science and Engineering IFR143-IFRESIS. AP has held a research fellowship grant from the Region Rhone Alpes.



## Principaux résultats/discussion de l'Article II:

Les modifications morphologiques entraînées par le collagène minéralisé sont comparées aux modifications morphologiques induites par la blebbistatine, molécule inhibant le fonctionnement de l'activité ATPase de la myosine de type II, car dans les deux cas, une décontraction cytosquelettique se produit, avec une disparition des fibres de stress et un maintien du réseau de microtubule. De plus, supports minéralisés et traitement à la blebbistatine induisent tous deux l'apparition de nombreuses extensions cytoplasmiques.

Mécano-sensation	Mécano-traduction	Gènes mécano-sensibles
- Prolongements cytoplasmiques (en fonction du d.o.m. et blebbistatine) - Délocalisation de l'appareil contractile à la périphérie cellulaire (sur ACC)	Gènes des FA >> Gènes des FB (ACC et blebbistatine) ↑ turnover des FA sur ACC ↑ FN (sur ACC)	↑↑ OPN (sur ACC) ↑ VEGF-A (en fonction du d.o.m.)

Ces observations sont concomitantes à une diminution de la durée de vie des FA, soit une augmentation de leur turnover. C'est cette augmentation du turnover et donc du recyclage des FA, avec la décentralisation de l'appareil contractile, que nous soupçonnons être à l'origine d'une augmentation de la mécano-sensibilité cellulaire par réactivation des intégrines, engendrée initialement par la morphologie cytosquelettique. L'augmentation de dépôt de fibronectine pourrait aussi permettre cette meilleure préhension environnementale par optimisation de l'engagement intégrinique.

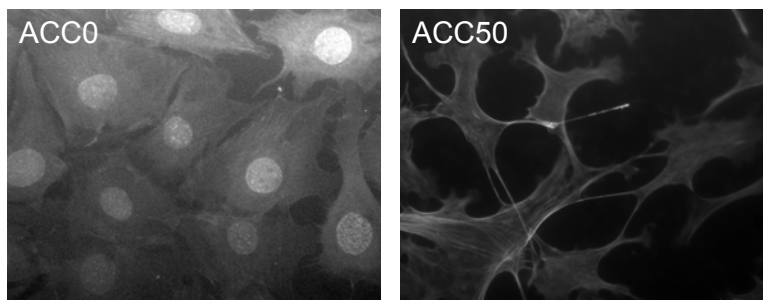
Le modèle du "clutch", décrit pour expliquer la migration cellulaire (que l'on sait augmentée sur les supports minéralisés (cf. D. Chapitre I. Le degré de minéralisation du collagène augmente de façon dose-dépendante le dépôt d'une matrice similaire à une ligne cimentante par des cellules pré-ostéoblastiques (Article I.)) explique les morphologies et caractéristiques observées sur ACC. Par ailleurs, ce modèle a été décrit comme contribuant à la mécano-traduction. Nous avons ainsi rattaché les modifications morphologiques et l'augmentation de mécano-sensibilité, liée à la décontraction cytosquelettique sur ACC, au modèle du "clutch interne" de la mécanique cellulaire, permettant un recyclage rapide des intégrines. Ces observations nous ont amenées à considérer les ACC comme des supports

mécanomimétiques, puisqu'ils retracent les comportements ostéoblastiques observés après stimulation mécanique exogène (augmentation de la production de FN, d'OPN, de VEGFA, avec une implication forte des FA).

### Résultats complémentaires à l'Article II:

Pour aller plus loin dans l'aspect de mimétisme mécanique du support, nous avons voulu connaître les capacités différenciantes de l'ACC. En effet de nombreuses données illustrent le potentiel ostéogénique des stimulations mécaniques exogènes, qu'elles soient de ha/bf ou de ba/hf, influençant la balance "voie ostéoblastique/voie adipogénique" chez les cellules souches mésenchymateuses (David et al., 2007; Huang et al., 2009a; Luu et al., 2009). Le modèle des pré-ostéoblastes MC3T3-E1 nous semblant imparfait dans cette description (diminution de l'expression du collagène de type I sur ACC, cf. D. Chapitre I. Le degré de minéralisation du collagène augmente de façon dose-dépendante le dépôt d'une matrice similaire à une ligne cimentante par des cellules pré-ostéoblastiques (Article I) ., diminution d'expression de la phosphatase alcaline, (cf. Figure 49), nous avons choisi de tester dans nos conditions de support de collagène minéralisé, le modèle des cellules souches mésenchymateuses C3H10T1/2.

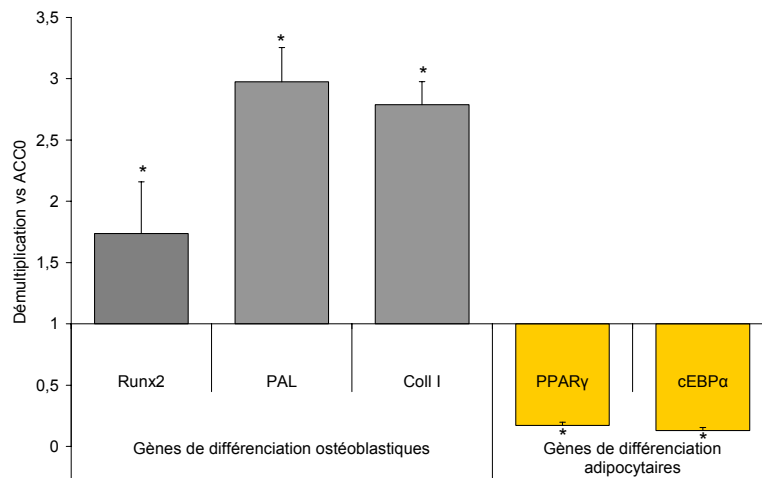
Nous avons tout d'abord vérifié que les supports ACC engendraient des modifications morphologiques sur ce type cellulaire, avec notamment une diminution de la taille cellulaire et l'apparition d'extensions cytoplasmiques, 32h après ensemencement (Figure 44).



**Figure 44: Morphologie des cellules C3H10T1/2 après 32h de culture sur un support de collagène de type I, ACC0 et un support de collagène de type I complexé à 50% d'apatite, ACC50.** Marquage des fibres d'actine à la phalloïdine (x400).

Après culture sur un support de collagène minéralisé (ACC50) pendant 5 jours (3 jours en milieu de culture normal et 2 jours en milieu de culture "permissif" (cf. G. Matériels et

méthodes), nous avons observé une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans l'orientation vers le linéage ostéoblastique (Runx2, phosphatase alcaline, collagène de type I), et une diminution de l'expression des gènes impliqués dans l'orientation vers le linéage adipocytaire (PPAR $\gamma$ , cEBP $\alpha$ ) (Figure 45).



**Figure 45: Différenciation des cellules souches mésenchymateuses C3H10T1/2 sur ACC50.**

\*: différence vs ACC0,  $p < 0,05$ ,  $n=3$ , abréviations: Runx2: Runt-related transcription factor 2, PAL: phosphatase alcaline, Coll I: Collagène de type I, PPAR $\gamma$ : Peroxysome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$ , cEBP $\alpha$ , ccaat/Enhancer Binding Protein  $\alpha$ .

Les supports ostéo-mimétiques ACC sont donc capables d'engager des cellules souches mésenchymateuses indifférenciées vers la voie ostéoblastique, donnant une caractéristique supplémentaire à l'aspect mécano-mimétique de ce matériau.

### **Chapitre III. Effets des micro-vibrations sur les pré-ostéoblastes en fonction du degré de minéralisation du collagène.**

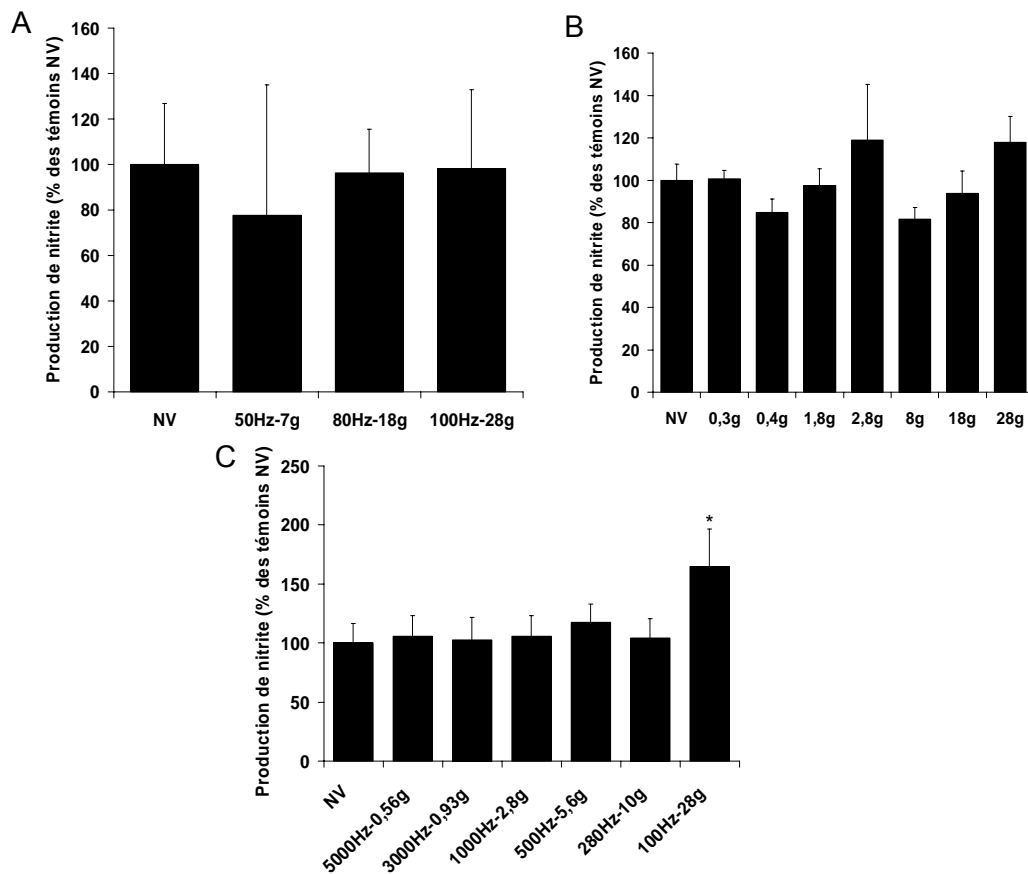
#### **Présentation:**

Les modifications morphologiques et de potentiel de mécano-traduction étant affectés lorsque les pré-ostéoblastes sont cultivés sur des supports de collagène minéralisé, nous avons voulu connaître la réponse cellulaire aux signaux les plus présents *in vivo*, soit les signaux de basses amplitudes et de hautes fréquences (ba/hf), signaux faisant actuellement l'objet de nombreuses recherches *in vivo*, mais dont l'effet *in vitro* est pratiquement inconnu sur les cellules osseuses (cf. B. Chapitre II - 2.3. Aux stimulations de basses amplitudes et de hautes fréquences (ba/hf) – les micro-vibrations (adapté de la revue (Vico et al., 2008))).

#### **Résultats/discussion:**

Pour cela, nous avons utilisé les cellules de la lignée MC3T3-E1 afin d'étudier à nouveau l'effet du micro-environnement sur les événements précurseurs à la phase de formation du remodelage osseux. Nous avons utilisé un appareillage capable de générer des stimulations ba/hf: le pot vibrant (vibration generator), dont l'utilisation initiale est liée aux tests de résistance de matériaux (cf. G. Matériels et méthodes).

Nous avons tout d'abord tenté d'isoler un ou des signaux capables d'augmenter la production d'oxyde nitrique (NO), molécule reconnue comme médiateur de la réponse osseuse aux signaux mécaniques (Turner et al., 1996), en appliquant des signaux sinusoïdaux ba/hf de courte durée, tel qu'il a été reporté dans une des seules études référentes *in vitro* sur les ostéoblastes (Bacabac et al., 2006). Nous avons appliqué ces signaux sur des boîtes de culture standard de 35mm. Nous avons tenté de faire varier les paramètres définissant le signal sinusoïdal, en fixant un des paramètres exposés dans les équations 1, 2, 3 ou 4 (cf. B. Chapitre II-2.1. Quelques notions physiques). Ainsi nous avons testé différents signaux ayant la même amplitude, la même fréquence, ou encore le même jerk, donné comme paramètre déterminant la réponse osseuse dans l'étude susmentionnée (une partie des résultats est présenté Figure 46).



**Figure 46: Effet des stimulations ba/hf sur la production de NO par les cellules ostéoblastiques MC3T3-E1.**

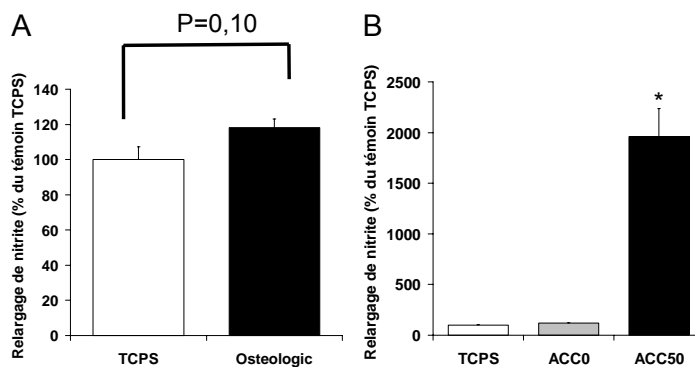
Des signaux ba/hf sont appliqués à (A) amplitude fixe à 0,7mm, (B) accélération fixe à 100Hz, (C) jerk fixe à  $173\text{km.s}^{-3}$  pendant 5 min à  $37^{\circ}\text{C}$ , 24h après ensemencement. Les milieux conditionnés sont récoltés 5min après le signal vibratoire (\*: différence vs témoin non vibré (NV),  $p < 0,05$ ,  $n=5$  pour (A) et (B)  $n=13$  pour (C)). La mauvaise reproductibilité des expérimentations de dosage de NO se voit notamment dans l'absence d'effet du signal 100Hz-28g en (A) et (B) (une tendance apparaît en (B)) alors que celui-ci a un effet en (C).

Malgré les nombreuses combinaisons de paramètres évalués, autant dans les caractéristiques des signaux que dans la durée d'application ou le temps de latence après application du signal vibratoire (cf. G. Matériels et méthodes, Tableau 3), nous ne sommes parvenus à identifier de signal capable d'augmenter la production de NO de manière reproductible, dans les timings et conditions d'ensemencement utilisés, en mode de vibration verticale ou horizontale, le dernier mode ayant été celui utilisé dans l'étude de Bacabac et al., 2006.

Cependant, un signal vibratoire augmente significativement la production de NO, bien que de façon non reproductible: le signal à 100Hz et 28g.

Ceci nous mène à une remarque: le jerk ne serait pas le paramètre déterminant la réponse osseuse, étant donné qu'au même jerk que celui produisant le plus de réponse dans l'étude de Bacabac et al., 2006, un seul signal est capable d'induire une réponse cellulaire en termes de production de NO, celui à 100Hz et 28g (presque identique au signal de plus haute fréquence dans l'étude référente, qui était de 100Hz-30g, procurant un jerk de  $186\text{km}\cdot\text{s}^{-3}$ ). En revanche, les fortes accélérations pourraient jouer un rôle (le signal à 100Hz et 28g comporte la plus grosse accélération testée).

Par ailleurs, nos supports de culture minéralisés (ACC) relarguent en grosse quantité du nitrite, produit de dégradation du NO, réellement dosée dans la méthode de dosage utilisée (cf. G. Matériels et méthodes). Un support commercialisé, BD Biocoat Osteologic™, montre aussi une tendance au relargage de nitrite (Figure 47).

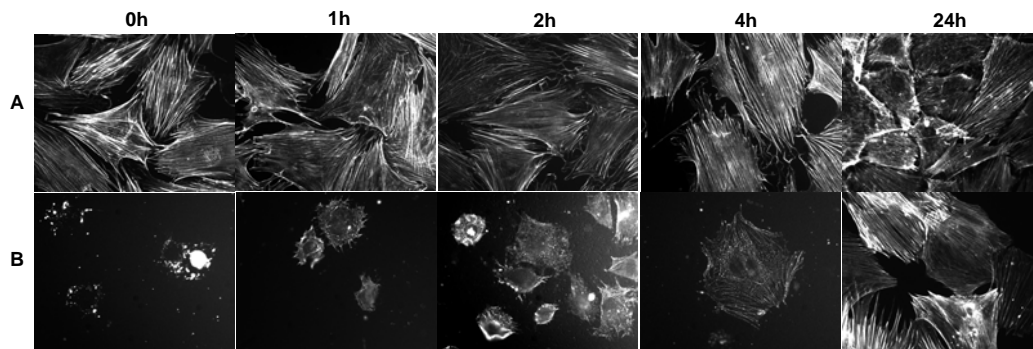


**Figure 47: Relargage de nitrite par les supports de culture minéralisés.**

\*: différence vs TCPS,  $p < 0,05$ ,  $n=3$  en (A) et  $n=6$  en (B).

Ce relargage important de nitrites, vestiges moléculaires de la présence de NO, pourrait aussi expliquer les comportements d'augmentation de mécano-sensibilité et de fonctionnalisation des matériaux de collagène minéralisé observés précédemment, de part le rôle de médiateur de la réponse à la contrainte mécanique joué par ce radical libre (cf. B. Chapitre II-1.3. Les marqueurs de mécano-sensibilité). Nous n'avons cependant pas regardé cet aspect, puisque la mise en présence d'ACC50 soluble (contenant donc les nitrites) sur les pré-ostéoblastes ne modifiait pas leur morphologie de la même façon que le minéral complexé aux supports de collagène, avec notamment une absence de prolongements cytoplasmiques (montrant par ailleurs l'importance de la topographie du support dans leur apparition). De plus, on peut voir que plus le minéral solubilisé est mis rapidement après l'ensemencement, moins les cellules s'étalent. Cette caractéristique se retrouve lorsque le minéral est complexé au support de

collagène, avec une diminution précoce de la taille cellulaire, montrant une influence possible de la chimie du support dans ce phénomène ([Figure 48](#)).



**Figure 48: Morphologie des cellules MC3T3-E1 mises en présence d'ACC50 solubilisé à différents temps après l'ensemencement.**

Marquage des fibres d'actine à la phalloïdine. Le nombre indiqué au-dessus de chaque photographie représente le temps après l'ensemencement sur ACC0, à partir duquel le milieu de culture est supplémenté par (A) 1ml du milieu neuf ou par (B) 1ml de milieu supplémenté par de l'ACC50 solubilisé (obtenu par scrapping de l'ACC50). Ces milieux sont laissés en présence des cellules pendant 24h (x400).

Nous n'avons ainsi pas testé de signaux ba/hf en méthode de dosage de nitrite sur les supports de collagène minéralisés ACC; les réactions de sécrétion de NO liées à une éventuelle réponse cellulaire auraient en effet été noyées par le nitrite environnant.

Nous avons alors choisit d'entamer une recherche de modification génique par biologie moléculaire sur les différents supports de culture, minéralisés ou non. Malheureusement, nous ne pouvions plus effectuer le signal à 100Hz-28g pour cause de défaillance du pot vibrant. A l'arrivée d'un nouveau pot vibrant, nous avons préféré limiter l'accélération des signaux utilisés. Nous avons alors utilisé deux signaux appliqués dans l'axe horizontal, se rapprochant le plus possible de ceux de l'étude de Bacabac et al., 2006, en termes de fréquence (l'accélération fut notre facteur limitant, pour les raisons de préservations du nouveau pot vibrant évoquées): un signal à 100Hz/12g et un autre à 30Hz/6g, proches des signaux de l'étude référente (100Hz/30g et 30Hz/16g).

Ainsi, nous avons observé, partant du profil génique décrit sur les différents matériaux ([Figure 49](#)), qu'en globalité (de façon non significative la plupart du temps), les signaux vibratoires diminuaient l'expression génique sur matériaux de collagènes minéralisés alors qu'une augmentation d'expression se produisaient sur les matériaux non minéralisés ([Figure 50](#)).

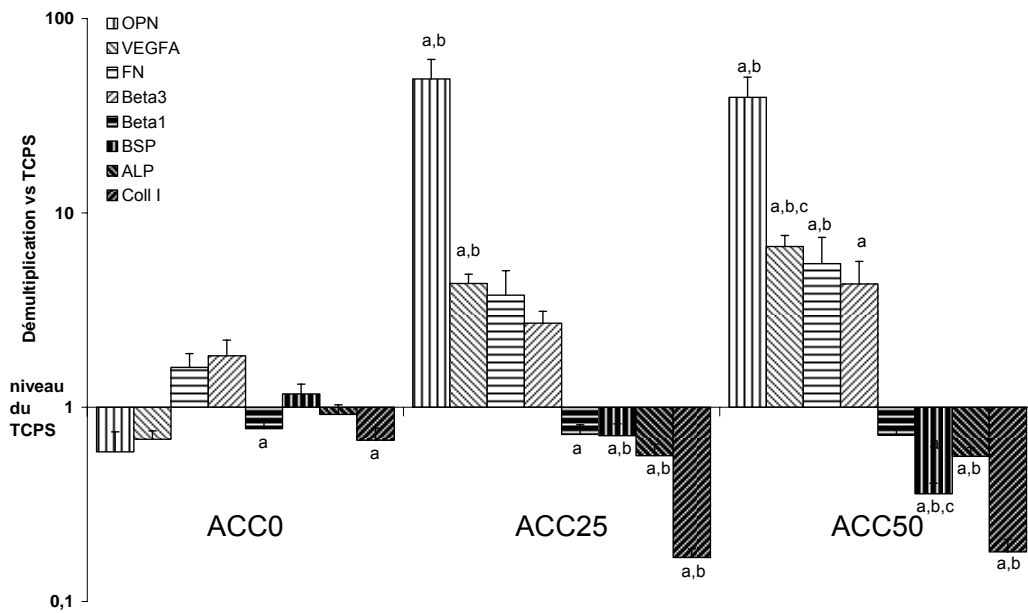


Figure 49: Signature génique de la lignée MC3T3-E1 après 32h de culture sur différents matériaux. a: différence vs TCPS, b: différence vs ACC0, c: différence vs ACC25,  $p < 0,05$ ,  $n = 9$ .

		OPN	FN	VEGF-A	Intégrine $\beta 3$	Intégrine $\beta 1$	PAL	Coll I
30Hz-6g	TCPS	0,82	3,21	1,76	2,67	0,53	1,55	1,12
	ACC0	1,93	1,19	2,00	0,92	0,88	0,80	1,02
	ACC25	0,60	0,68	0,94	0,71	0,35	0,51	0,83
	ACC50	1,04	0,55	0,56	0,78	0,52	0,60	0,62
		OPN	FN	VEGF-A	Intégrine $\beta 3$	Intégrine $\beta 1$	PAL	Coll I
100Hz-12g	TCPS	0,12	1,34	1,35	2,84	0,55	1,06	0,97
	ACC0	1,44	0,71	1,36	1,50	0,96	0,59	1,13
	ACC25	0,69	0,58	0,72	1,89	0,47	0,63	1,08
	ACC50	1,16	0,26	0,44	0,76	0,84	0,47	0,64

Figure 50: Modulations géniques après stimulations vibratoires de 5 min (le nombre indique la démultiplication par rapport au support de même type, non stimulé).

Les cellules de la lignée MC3T3-E1 sont stimulées pendant 5 min à 37°C aux régimes indiqués, 24h après ensemencement. Les boîtes de culture témoins et stimulées sont alors replacées à 37°C pendant 8h (temps de latence après stimulation déterminé par cinétique d'expression). L'extraction est ainsi établie 32h après l'ensemencement.

En orange: augmentation d'expression par rapport au même support non vibré. En bleu: Diminution d'expression par rapport au même support non vibré. Les hachures dans les cases dénotent une significativité par rapport au même support non stimulé,  $p < 0,05$ ,  $n = 5$ . La ligne rouge sépare les supports minéralisés des supports non minéralisés.



Ainsi, la réceptivité aux signaux mécaniques exogènes semble être modifiée dès que les matériaux de collagène sont minéralisés, montrant que les cellules ostéoblastiques interprètent différemment le signal selon la minéralisation de leur support de culture (et la fonctionnalisation matricielle spécifique que cela comprend). Cette réponse différentielle pourrait provenir des différences de mécano-traduction soulignées dans l'Article II. Ainsi, un même signal mécanique serait différemment interprété selon la minéralisation de la matrice sur laquelle la cellule ostéoblastique adhère (constituant un signal mécanique endogène), le signal exogène pouvant être interprété comme stimulant mécanique dans un cas (TCPS, ACC0) ou stress mécanique dans l'autre cas (ACC25, ACC50). Par ce terme de stress mécanique est sous entendu le fait que les signaux utilisés ne seraient pas adaptés à la culture de pré-ostéoblastes sur des surfaces de collagène minéralisé, du fait de leur hypersensibilisation aux signaux environnementaux. Ainsi, le paradoxe soulevé plus haut (cf. B. Chapitre II-2.5. Hautes ou basses amplitudes...Un paradoxe...), ne pourrait en fait relever que de la qualité du support de culture, plan et rigide dans un cas (*in vitro*), nécessitant de fortes stimulations mécaniques pour éliciter une réponse cellulaire (car les cellules ne seraient pas pré-sensibilisées par le support de culture), et tridimensionnel et remodelable dans l'autre cas (*in vivo*), sur lesquels les cellules seraient capables de répondre à de faibles stimulations (car les cellules seraient pré-sensibilisées par leur support de culture). Si des contraintes mécaniques "trop brutales" étaient appliquées dans ce dernier cas, un stress mécanique engendrant des effets néfastes pourrait apparaître, tel qu'il est observé ici.

Selon l'hypothèse avancée dans l'Article II, les signaux vibratoires pourraient déstructurer les contacts focaux des cellules sur leurs supports respectifs. Sur TCPS et ACC0, cette déstructuration pourrait aboutir à une diminution de la durée de vie des contacts focaux, renforçant la mécano-traduction. A l'inverse, sur ACC25 et ACC50, supports minéralisés, la déstructuration des contacts focaux pourrait empêcher leur remodelage rapide, et ainsi diminuer les capacités de mécano-traduction sur ces supports, aboutissant à un effet inhibiteur par rapport aux mêmes supports non stimulés (l'expression finale après micro-vibrations sur les supports minéralisés reste toutefois supérieure à l'expression finale sur les supports non minéralisés pour les gènes déjà augmentés par la minéralisation du collagène, due à l'expression génique de base déjà exacerbée sur ACC (cf. Figure 49).

E . DISCUSSION  
GENERALE &  
PERSPECTIVES

Notre étude sur supports ostéo-mimétiques nous a montré l'importance du micro-environnement physico-chimique sur le comportement de cellules ostéoblastiques (allant de la migration à la différenciation) et dans les réponses que ces cellules pouvaient donner aux stimulations exogènes les plus présentes *in vivo*. La qualité de la MEC a été relevée dans de nombreuses études comme influant sur le comportement cellulaire (cf. B. Chapitre I-2. Interactions matrice-cellules osseuses), faisant des supports de polystyrène traité, utilisés dans la majorité des études sur les cellules osseuses, pour des raisons de simplicité d'utilisation (renfort de l'adhérence cellulaire, asepsie contrôlée, imagerie non perturbée), un support totalement incomplet pour l'étude de cellules adhérentes. Le rôle des cellules ostéoblastiques est de synthétiser, mais aussi de remodeler la MEC. En face d'un support plan, rigide et non remodelable comme peuvent l'être les boîtes de culture classiques, les cellules génèrent de grosses forces de traction (Engler et al., 2006) afin de remodeler la matrice sur laquelle elles sont déposées, contractant leurs "muscles" (représentés par les fibres de stress) au maximum. Dans ces conditions d'hyper-tension globale, les cellules ostéoblastiques ne pourraient plus réorganiser leur appareil contractile, altérant leur mécano-sensibilité. En revanche, sur des supports ostéo-mimétiques, les cellules ostéoblastiques pourraient refaçonner à loisir leur appareil contractile et la matrice, les rendant potentiellement plus sensibles aux signaux mécaniques endogènes et exogènes. D'autres limites liées à la culture *in vitro* standardisée peuvent être évoquées; le micro-environnement chimique n'est en effet pas respecté, avec des milieux de cultures comprenant des taux de glucose, de sérum ou d'acides aminés extrêmement élevés par rapport aux milieux naturels. De même, le micro-environnement gazeux des incubateurs classiques de culture cellulaire ne respecte pas les pressions partielles tissulaires, notamment en termes d'oxygène. Si les effets de ces paramètres chimiques et gazeux sont aussi drastiques que l'effet du micro-environnement matriciel sur le comportement cellulaire, la compréhension fine des phénomènes biologiques serait grandement entâchée. Dans notre but ultime de création d'un modèle de remodelage osseux *in vitro*, ces différents paramètres physico-chimiques seraient à prendre en compte. Il serait également informatif, dans l'optique de comprendre les événements précoces à la phase de formation, et ayant montré la synthèse d'une matrice ressemblant à la ligne cémentante par les pré-ostéoblastes cultivés sur ACC (cf C. Chapitre I. Le degré de minéralisation du collagène augmente de façon dose-dépendante le dépôt d'une matrice similaire à une ligne cémentante par des cellules pré-ostéoblastiques (Article I)), d'établir des cocultures cellules pré-ostéoblastiques-cellules macrophagiques sur ACC. Nous nous rapprocherions ainsi plus de l'état physiologique, les deux types cellulaires ayant été observés durant la phase de réversion du remodelage osseux (cf B. Chapitre I-

1.2.1. Les différentes phases). De plus, étant donnée l'importance de l'état matriciel au sein d'une BMU après l'une ou l'autre des étapes du cycle, des cocultures cellules ostéoblastiques-cellules ostéoclastiques seraient à effectuer de manière séquentielle. Par ailleurs, afin d'étudier le comportement de pré-ostéoblastes, nous n'avons pas supplémenté le milieu de culture en  $\beta$ -glycéro-phosphate ou en acide ascorbique, facteurs solubles permettant la différenciation vers l'ostéoblaste. Il serait cependant intéressant de connaître l'effet de ces matériaux sur des ostéoblastes pleinement différenciés, comme des ostéoblastes primaires, dont on sait la morphologie affectée de la même façon que les pré-ostéoblastes sur les supports de collagène minéralisé.

Cette morphologie particulière et le comportement migratoire observés dans nos conditions de culture sur supports de collagène minéralisé dénotent un environnement tri-dimensionnel, ou uni-dimensionnel, pour reprendre l'abus de langage utilisé par Doyle et al., 2009, terme pouvant être mieux adapté aux ACC. Ces supports de culture pourraient en effet être vus comme des supports uni-dimensionnels "brisés" (des lignes aléatoires se dessinant entre les minéraux). Les extensions cytoplasmiques liées à ce type de supports (1D et 3D) permettent la préhension du micro-environnement, avec un grand diamètre exploratoire, tout en minimisant le coût énergétique lié à la migration, comportement exploratoire complètement adopté par les neurones (Davenport et al., 1993). La migration étant de plus elle-même augmentée sur les supports ACC, l'exploration environnementale se voit alors optimisée, pouvant apporter une quantité d'informations environnementales encore plus importante à la cellule. Le matériau ACC pourrait être rendu réellement tri-dimensionnel par l'épaississement de sa phase organique, afin d'apprécier si les comportements observés se retrouvent bien à l'identique, ce qui permettrait de pousser encore plus près le mimétisme des phases du remodelage osseux. De plus, cet épaississement de la phase organique, tel qu'elle avait été créée pour le matériau ACC dans les années 70 (Banks et al., 1977), pourrait permettre un meilleur complexe avec la phase minérale, ce qui éviterait le délitement minéral sur de longues périodes de culture. Cet aspect temporel a aussi une importance dans la qualité de la phase minérale de l'ACC. Nous avons en effet utilisé dans nos études des ACC "fraichement" synthétisés, car avons remarqué que le ratio Ca/P (proche de 1,67, attestant de la similitude avec le minéral osseux) augmentait avec le temps de stockage des matériaux à 4°C (une étude cristalline serait intéressante à entreprendre pour comprendre les modifications occasionnées). De futurs travaux sur ce support de culture devront contrôler cet aspect, pour ne pas avoir de biais lié à la qualité de la phase minérale.

Ces différentes observations nous mènent au dogme du rapport structure-fonction, bien connu en physiologie. Il est aussi connu que la mécanique cellulaire affecte la forme des tissus *in vivo*, cette dernière influant sur le comportement cellulaire, en rétrocontrôle (Ingber, 2005; Nelson et al., 2005), respectant ainsi le dogme. Au sein du tissu osseux, les ostéocytes nous semblent être un parfait exemple du rapport structure-fonction dans la mécanique cellulaire. Ces cellules présentent en effet une constante de rigidité faible par rapport aux ostéoblastes, celle-ci étant plus importante aux extrémités cellulaires, représentées par le réseau dendritique de ces cellules (Sugawara et al., 2008) (ces extrémités étant plus mécano-sensibles (Adachi et al., 2009)). Ceci illustre une relaxation cytosquelettique générale et une délocalisation vers la

périphérie de la tension cellulaire, liée aux fibres d'actine (Haga et al., 2000), largement présentes dans ces extensions (Kamioka et al., 2004; Murshid et al., 2007; Tanaka-Kamioka et al., 1998). Avec un fort taux d'expression des intégrines  $\beta 3$  (Bennett et al., 2001), et donc de l'appareil mécano-traducteur (Roca-Cusachs et al., 2009), le rôle mécano-senseur privilégié de ces cellules pourrait ainsi être expliqué, selon nos résultats, par leur morphologie et la délocalisation de leur appareil contractile à la périphérie cellulaire. De plus, leur aspect sphérique au sein des lacunes ostéocytaires pourrait renforcer la décontraction de leur cytosquelette au centre de la cellule, augmentant leur mécano-sensibilité (Bacabac et al., 2008), par une capacité de réorganisation rapide de leurs constituants. Outre cette similitude possible dans la mécano-traduction entre nos cellules cultivées sur ACC et les ostéocytes, de nombreux paramètres nous font penser que les pré-ostéoblastes cultivés sur ces supports de collagène minéralisé pourraient s'engager vers une voie de différenciation ostéocytaire, en accord avec une étude montrant le rôle de la minéralisation dans l'engagement dans cette voie (Irie et al., 2008):

- Leur morphologie dendritique, la diminution de la taille cellulaire (Franz-Ondendaal et al., 2006; Palumbo, 1986) et une distribution de la tension cellulaire en périphérie, comme évoqué ci-dessus.
- Leur expression matricielle avec une diminution de l'expression du collagène de type I, de la phosphatase alcaline et une augmentation d'expression de l'ostéopontine (Aarden et al., 1996; Boukhechba et al., 2009; Franz-Ondendaal et al., 2006).
- L'augmentation d'expression de l'intégrine  $\beta 3$  (Bennett et al., 2001).
- La diminution de l'aire des contacts focaux (Sugawara et al., 2008).
- L'augmentation de la motilité (Dallas et al., 2009).

De plus, la diminution de la taille des pré-ostéoblastes cultivés sur ACC montre un défaut d'étalement, ou plutôt un étalement adapté à la surface de collagène minéralisé. La qualité de cet étalement est capable de dicter le comportement de prolifération, de différenciation ou d'apoptose des cellules adhérentes (Chen et al., 1997; Dike et al., 1999; Huang and Ingber, 2000; Liu and Chen, 2007; Singhvi et al., 1994). En effet, des cellules endothéliales cultivées sur des "îlots" microfabriqués de différentes tailles montrent une prolifération sur les plus grands îlots, lorsque les cellules sont complètement étalées, alors qu'une apoptose se produit sur les îlots les plus petits, lorsque les cellules sont rétractées. Sur les îlots de taille moyenne, les cellules présentent un étalement moyen et engagent un programme de différenciation (Dike et al., 1999). Il est ainsi possible que dans nos conditions de culture sur ACC, le degré d'étalement obtenu soit efficace pour l'enclenchement d'un programme de différenciation.

Toutefois, il reste bien sûr à montrer que les pré-ostéoblastes cultivés sur ACC expriment SOST, DMP1 ou encore E11 pour pouvoir les qualifier de cellules ostéocytaires. L'ACC pourrait aussi être utilisé pour la culture de lignées ostéocytaires, plus particulièrement de la lignée MLO-Y4, permettant leur différenciation complète. Il a en effet été suggéré qu'un modèle *in vitro* de support minéralisé pourrait combler les défauts de cette lignée (manque d'expression de DMP1 et de SOST) (Yang et al., 2009). Ce matériau pourrait aussi être utilisé afin de maintenir à longs termes l'état de différenciation d'ostéocytes primaires. En effet, il a été montré, pour un autre type cellulaire emprisonné dans sa MEC, le chondrocyte, que la culture bi-dimensionnelle induisait une dé-différenciation vers un phénotype fibroblastique (Holtzer et al., 1960), à l'inverse de la culture tri-dimensionnelle, capable de maintenir en état leur différenciation (Abbott and Holtzer, 1966; Benya and Shaffer, 1982). De façon intéressante, l'altération chimique du cytosquelette d'actine, rendant les chondrocytes plus sphériques par diminution de la tension cellulaire (comme lors de la culture tri-dimensionnelle), est aussi capable de restaurer partiellement leurs marqueurs phénotypiques lors de la culture bi-dimensionnelle (Newman and Watt, 1988; Zanetti and Solursh, 1984).

Le degré d'étalement précédemment évoqué modifie la forme de la cellule et cette forme, régulant le devenir cellulaire (Folkman and Moscona, 1978), est sous la dépendance du cytosquelette, dont l'organisation est largement contrôlée par la famille Rho des GTPases (cf. B. Chapitre II-1.1.2. La migration cellulaire) (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Notamment, la contractilité des fibres d'acto-myosine, générant la tension cellulaire, est régulée par la GTPase RhoA, protéine jouant un rôle dans la prolifération (Huang et al., 1998; Nelson et al., 2005) et la différenciation cellulaire (Arnsdorf et al., 2009; Wozniak et al., 2003). Par ailleurs, les GTPases Rac et cdc42 ont respectivement un rôle dans l'émission de lamellipodes et de filopodes. Nous pouvons penser que sur les supports ACC, une régulation localisée de ces constituants se produit, amenant au comportement global observé. Les expressions de Rac et cdc42 doivent en effet se produire à des endroits précis lors de la migration cellulaire. La morphologie des pré-ostéoblastes cultivés sur ACC nous informe aussi que l'expression de ROCK, kinase de RhoA contrôlant l'apparition des fibres d'acto-myosine, doit être élevée en périphérie et basse au centre de la cellule. Plus exactement, il est possible qu'une expression préférentielle des isoformes de ROCK se produise chez les pré-ostéoblastes cultivés sur ACC. Cette kinase présente en effet deux isoformes aux substrats identiques (MLC2, MYPT1, cf. B. Chapitre II-1.1.1.1. Les microfilaments), nommées ROCK I et ROCK II, dont les répartitions diffèrent, ROCK I étant diffus et périnucléaire et ROCK II

étant périnucléaire et associé à la membrane (Yoneda et al., 2005). Leurs activités sont aussi spécifiques, ROCK I étant impliqué dans la formation des fibres de stress et des adhésions focales, ROCK II permettant une activité de phagocytose de la MEC et une inhibition de la formation des fibres de stress chez les fibroblastes. De plus, une hypertrophie cellulaire est liée à la déplétion de ROCK II (Yoneda et al., 2005). Ces différents éléments nous laissent penser que chez les pré-ostéoblastes cultivés sur ACC, ROCK II pourrait être plus actif que ROCK I de par l'absence globale de fibres de stress, la localisation périphérique de la MLC2 et la diminution de la taille cellulaire observée. De plus, ROCK II possède un rôle important dans la fibrillogénèse de la fibronectine, augmentée sur ACC, et l'absence de ROCK I stimule cdc42 et l'apparition d'extensions cytoplasmiques (Yoneda et al., 2007), nombreuses lors de la culture sur ACC. Il est de plus intéressant de noter que la régulation des fibres de stress se situe au centre de cellule en cas d'activation par ROCK (donc ROCK I) et en périphérie de la cellule en cas d'activation par MLCK (Totsukawa, 2000), mettant un autre acteur que ROCK II dans la répartition périphérique de l'appareil contractile. Il serait ainsi très informatif de doser l'activité et la répartition des GTPases, des isoformes de ROCK et de MLCK chez les pré-ostéoblastes cultivés sur ACC, afin de connaître les acteurs de mécanique cellulaire mis en jeu.

Du fait des modifications de mécanique cellulaire observées sur les supports ostéomimétiques ACC, supports plus physiologiques, en qualité, que les supports habituels de tests, il serait intéressant de tester l'action de médicaments à visée anti-ostéoporotique, maladie osseuse prenant de plus en plus d'ampleur avec le vieillissement des populations. Il serait également informatif de tester des contraintes mécaniques se rapprochant encore plus des signaux retrouvés *in vivo*, avec une faible présence des signaux de hautes amplitudes et une forte présence des signaux de basses amplitudes (Fritton et al., 2000), en appliquant des bruits. Ces signaux mécaniques aléatoires sont régis par la "densité spectrale de puissance", une fonction permettant d'englober différentes fréquences contenues dans un signal stochastique, de façon proportionnelle à  $1/f^\beta$ . Ainsi sont distingués différents bruits selon la valeur affectée à  $\beta$ , modifiant la qualité du signal. Un bruit blanc ( $\beta=0$ ), dans lequel les intensités sont identiques avec l'augmentation en fréquence, un bruit rose ( $\beta=1$ ), faisant décroître l'intensité du signal avec l'augmentation en fréquence, un bruit rouge ( $\beta=2$ ), permettant une décroissance encore plus abrupte de l'intensité du signal avec l'augmentation en fréquence. Bruits rose et rouge se rapprochent ainsi encore plus des signaux reçus par le tissu osseux *in vivo*, pouvant procurer aux cellules osseuses une combinaison de signaux

mécaniques (en termes d'amplitude, de fréquence, d'accélération). Les combinaisons de signaux pourraient en effet revêtir un aspect aussi important que le taux de contrainte, l'accélération ou les répétitions du signal, comme cela a déjà pu être montré *in vitro* (Dumas et al., 2009; Tanaka et al., 2003b).

Enfin, ce travail nous a amené à réunir des visions, à priori opposées, de la mécanique et de la mécano-traduction cellulaire. Quant à la mécanique cellulaire, nous avons pu établir un parallèle entre les modèles de la tenségrité et du "clutch", les deux étant basés sur les mêmes structures cellulaires, que sont les intégrines et les microtubules. En fait, le premier modèle décrirait un comportement global alors que le second décrirait un comportement local. Lors de la culture de cellules sur des supports 2D/dur/non remodelables tel le TCPS, les grosses forces de tension développées par les fibres de stress, en vue de remodeler la MEC, pourraient être équilibrées par les intégrines (Ingber, 2003a), les microtubules ne pouvant alors plus jouer leur rôle de résistance à la compression (Stamenovic et al., 2002). Les intégrines devraient alors rester en place pour le maintien de la tenségrité, générant un patinage de l'embrayage ("frictional slippage" du modèle du "clutch" (cf B. Chapitre II-1.1.5. La théorie du "clutch" = théorie de l'embrayage)), ce qui procurerait une transmission statique des informations environnementales, et permettrait la formation locale de lamellipodes, de par leur fonction de "clutch externe" dans le blocage du flux (la tension) rétrograde d'actine sur substrats rigides (Rhee and Grinnell, 2007). A l'inverse, lors de la culture sur des supports 3D=1D/mou/remodelables tel l'ACC, les forces de tensions, moindres (fibres de stress peu voire pas présentes), seraient équilibrées par les microtubules (Ingber, 2003a). Dans ces conditions, ces-derniers joueraient le rôle de "clutch interne", formant localement des filopodes (Rhee and Grinnell, 2007; Rhee et al., 2007). Les intégrines n'étant plus dévouées au maintien de la tenségrité, pourraient être recyclées par les microtubules (Ezratty et al., 2009), permettant un entretien dynamique de la transmission des informations environnementales, ce qui pourrait être une base au mécanisme de charge et décharge de l'embrayage ("load and fail" du modèle du "clutch" (cf B. Chapitre II-1.1.5. La théorie du "clutch" = théorie de l'embrayage)).

En ce qui concerne la mécano-traduction cellulaire, certains mentionnent le fait que les cellules doivent avoir un fort câblage cytosquelettique afin de permettre la transduction du signal (Colombelli et al., 2009; Ingber, 2003b) alors que d'autres mentionnent une augmentation des capacités de mécano-traduction lorsque les cellules sont relaxées, avec un cytosquelette moins structuré (Bacabac et al., 2008; Ghosh et al., 2008; Zhang et al., 2006a).



Nous avons montré l'importance potentielle de la localisation des constituants de la contractilité cellulaire pour une mécano-traduction optimale (liée ici au support de culture seulement, les signaux mécaniques exogènes s'étant révélés inappropriés): le corps cellulaire devrait posséder un cytosquelette relâché, rendant possible tout réarrangement moléculaire, alors que les extensions cytoplasmiques devraient contenir l'appareil contractile mécano-sensible. Cette distribution des constituants cellulaires, en vue de la mécano-traduction, pourrait ainsi dépendre de la qualité de la MEC, et plus particulièrement de sa dimensionnalité.

Ces différentes visions de la mécanique et de la mécano-traduction cellulaire trouvent quoiqu'il en soit leur place *in vivo*. En effet, la MEC osseuse, en remodelage permanent, pourrait procurer alternativement des environnements bi- ou tri-dimensionnels aux cellules ostéoblastiques, influant sur leur comportement de prolifération, de différenciation et de mécano-sensibilité.

## F . CONCLUSION

**Il ne faut pas se fier aux apparences...**

Nos connaissances en culture cellulaire "de routine" nous informent que de "beaux" ostéoblastes doivent présenter de nombreuses fibres de stress et un grand étalement, afin d'obtenir des synthèses matricielles convenables. Hors, la culture de cellules ostéoblastiques sur ACC nous a montré que des cellules ne présentant qu'un réseau cortical de fibres d'actomyosine et un faible étalement, qui aurait présagé d'une mort cellulaire certaine, étaient, contre toute attente, capables d'augmenter leurs synthèses matricielles par rapport aux supports de culture standard, formant une interface ressemblant à celle déposée *in vivo* par les cellules de la ligne cimentante. Les fibres de stress, gage de qualité de la culture *in vitro*, ne sont en fait que rarement observées *in vivo*, quelque soit le type cellulaire, montrant que leur présence ne pourrait être qu'un artéfact lié à la qualité des supports employés dans les études *in vitro* (Dubash et al., 2009). Un autre comportement contre intuitif observé sur les supports ACC fut la réponse pro-migratoire mais aussi pro-adhésive (et ce malgré l'absence de fibres de stress) des pré-ostéoblastes, permettant vraisemblablement une meilleure préhension environnementale. Ces observations sont inhérentes aux qualités physico-chimiques du support de culture ostéo-mimétique utilisé et à la fonctionnalisation matricielle effectuée par les pré-ostéoblastes. De plus, il faut prendre conscience que l'observation de l'augmentation de l'adhérence dénote un comportement global. La migration requiert en effet un fort attachement à un instant et une zone cellulaire donnés, afin que la cellule puisse se déplacer sans se détacher de son support, l'instant d'après nécessitant un attachement moindre dans cette zone, afin de rétracter la partie fortement ancrée (DeMali and Burridge, 2003; Ridley et al., 2003). Ainsi, des observations inattendues pour la culture cellulaire "classique" trouvent leur explication dans la qualité du support de culture. De par les observations mentionnées dans ce travail, il nous apparaît nécessaire d'étudier les cellules osseuses dans des environnements plus physiologiques, ostéo-mimétiques, afin d'abaisser la barrière séparant les micro-environnements cellulaires *in vivo* et *in vitro*. Ceci pourrait amener une reconsidération de nos connaissances en biologie des cellules osseuses.

**Dr Jekyll et Mr Hyde...**

De façon intéressante, le comportement des deux lignées de cellules osseuses ostéoclastiques et ostéoblastiques est le même sur les matériaux de collagène minéralisé ACC. En effet, dans les deux cas sont observées une périphéralisation de l'appareil contractile (sealing zone pour

l'ostéoclaste (Saltel et al., 2004)), une modification des activités des RhoGTPases (Destaing et al., 2005; Saltel et al., 2004) (seulement présumée ici pour les cellules ostéoblastiques), une augmentation d'activité (résorption pour les ostéoclastes (Saltel et al., 2004; Shibutani et al., 2000)) et une augmentation de l'adhérence cellulaire, que nous avons pu observer lors de culture de cellules macrophagiques de la lignée RAW264.7, se différenciant en ostéoclastes sous stimulation cytokinique (RANKL, M-CSF). Des cellules osseuses d'origines différentes et à actions opposées pourraient ainsi avoir développé le même phénotype contractile et la même mécanique cellulaire afin de s'adapter aux surfaces de collagène minéralisé. Ces cultures ostéoclastiques (macrophagique) et ostéoblastiques sur ACC annoncent ainsi la coculture, afin de se rapprocher au plus du remodelage osseux *in vivo*.

### **Cassandra, Nostradamus et al. ou les doigts dans le cambouï de la mécanique cellulaire**

Par ailleurs, nous avons été amené à considérer le support de culture ACC comme un support mécano-mimétique. Les contraintes mécaniques endogènes (topographie, rigidité, dimensionnalité) en résultant sont alors permanentes pour les cellules ostéoblastiques évoluant à leur surface, modifiant la distribution de leur appareil mécano-traducteur, ce qui pourrait sensibiliser la cellule aux signaux mécaniques exogènes. Il serait ainsi primordial de comprendre les effets du support de culture sur la mécanique cellulaire avant de pouvoir qualifier des signaux mécaniques exogènes: les effets du micro-environnement endogène sur la mécanique cellulaire pourraient en effet servir de prédicteur à la qualité des stimuli exogènes capables d'induire une réponse. Ces derniers signaux sont eux-mêmes capables de réorganiser l'appareil mécano-traducteur, fait montré pour différents types cellulaires (Cucina et al., 1995; Endlich et al., 2001; Gavara et al., 2008; Gunst et al., 2003; Sato et al., 2005), des boucles de rétrocontrôles entre la cellule et "ses micro-environnements endogènes et exogènes" pourraient alors s'établir.

De nouveaux signaux mécaniques, mais aussi chimiques, sous forme insoluble ou soluble pourraient aussi se produire lors de la culture à long terme de cellules ostéoblastiques sur ACC. Ces nouveaux signaux devraient engendrer de nouvelles capacités de mécano-traduction. En effet, nous avons observé que les pré-ostéoblastes ou des ostéoblastes primaires recouvraient la totalité des matériaux ACC après 14 jours de culture. Dans ces conditions, l'aspect migratoire se voit certainement modifié, pouvant affecter le reste de la machinerie cellulaire décrite. Les modifications matricielles ayant lieu au cours du remodelage osseux pourraient de la même manière procurer des signaux physico-chimiques endogènes aux

## F. CONCLUSION

cellules de la lignée ostéoblastique, afin de dicter leur comportement de prolifération, de différenciation ou de mécano-sensation aux informations mécaniques exogènes, de manière appropriée à leur localisation et à la phase du cycle de remodelage.

# G. MATERIELS & METHODES

Sont exposées dans cette section les techniques employées dans les résultats des chapitres II et III, non présentées dans les matériels et méthodes des deux articles.

**Conditions de culture des cellules souches mésenchymateuses C3H10T1/2:**

Ces cellules sont des cellules souches mésenchymateuses d'une lignée immortalisée provenant d'un d'embryon murin, obtenues chez ATCC (CCL-226). Elles sont entretenues dans du milieu  $\alpha$ MEM supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (ATGC Biotechnologies, Marne-la-Vallée, France, lot 916996), 2mM de L-glutamine et des antibiotiques (50U/ml pénicilline, 50 $\mu$ g/ml streptomycine) dans des flasques de 75cm<sup>2</sup> placées en atmosphère humide réglée à 5% CO<sub>2</sub> et 37°C. Ces cellules sont cultivées jusqu'au 15<sup>ème</sup> passage.

Le décollement cellulaire est effectuée à subconfluence par rinçage au tampon citrate puis par l'utilisation de trypsine-EDTA 1X (Sigma) puis ensemencement dans 2mL de milieu de culture utilisé pour l'entretien cellulaire, dans des boîtes de culture de 35mm (Falcon). L'ensemencement est normalisé afin d'atteindre un nombre de cellules identique quelque soit le support de culture (minéralisé ou non), 32h après l'ensemencement. Les C3H10T1/2 sont alors cultivés pendant trois jours dans les conditions de l'entretien cellulaire puis le milieu est changé en milieu contenant 50 $\mu$ g/ml d'acide ascorbique, 10<sup>-6</sup>M de  $\beta$ -glycero-phosphate, 10<sup>-8</sup>M de dexamethasone, 5x10<sup>-5</sup>M d'isobutylmethylxanthine, 1 $\mu$ l/ml d'insuline and 10<sup>-8</sup> M d'acide rétinoïque pour deux jours supplémentaires. Ce milieu "permissif" autorise la différenciation ostéogénique ou adipogénique.

**Amorces de biologie moléculaires supplémentaires:**

Gènes	Amorce sens	Amorce antisens	Taille du produit (pb)	Source
<b>Runx2</b>	5'CCGGGAATGATGAG AACTAC3'	5'TGTCTGTGCCTTCTT GGTTC3'	223	NM009820.2
<b>cEBP<math>\alpha</math></b>	5'CAAGCCAGGACTAG GAGATT3'	5'CCAAGGCACAAGGT TACTTC3'	203	NM007678.3
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	5'GAAATTACCATGGT TGACACAGAG3'	5'GTGAATGGAATGTC TTCATAGTG3'	170	NM011146.2
<b>RANKL</b>	5'CCAGCTATGATGGA AGGCTCA3'	5'CGTACAGGTAATAG AAGCCA3'	223	NM011613.3
<b>OPG</b>	5'GCACCCTGTATAAA ACACA3'	5'CCGTTTATCCTCTC TACA3'	255	NM008764.3
<b>VEGF-R1</b>	5'GCCCTGACAGTAT TATACA3'	5'GCTCCTCCTGTCCA GGTTA3'	232	NM010228.3
<b>CD44</b>	5'CCTGCCGCTACGCA GGTGTA3'	5'GGAGGTGTTGGACG TGACGA3'	260	NM009851.2

**Appareillage de vibrations:**

Afin de générer des accélérations sinusoïdales à des boîtes de Pétri, nous avons utilisé un pot vibrant (TIRAGmbH), appareil fonctionnant selon le principe d'un électroaimant. Ce pot vibrant est relié, par l'intermédiaire d'un amplificateur, à un ordinateur stockant le signal voulu (dans un fichier son) ou à un générateur de signaux. Un support est fixé au pot vibrant afin de maintenir cinq boîtes de cultures en position horizontale ou verticale par rapport à la source du signal (Figure 51). Des accéléromètres permettent un contrôle en boucle d'asservissement du signal émis. La durée d'application des signaux, le type de signal ainsi que les durées avant et après le signal pour le dosage de NO sont exposées dans le [Tableau 3](#). Pour ces dosages, les cellules sontensemencées à  $0,4 \times 10^5$  ou  $1 \times 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup> dans des boîtes de culture de 35mm de diamètre et le milieu est changé juste avant application du signal vibratoire par du milieu contenant 2% de SVF. Pour les extractions géniques, les lysats de culture pour extraction des ARNm sont récoltés 8h après une session vibratoire de 5min sur les différents supports de culture minéralisés (ACC25, ACC50) ou non (TCPS, ACC0), soit 32h après l'ensemencement.



Tableau 3; Différentes modalités de contraintes utilisées pour les dosages de NO

Axe de vibration	Amplitude (en mm)	Fréquence (en Hz)	Accélération (en g)	Jerk (en $\text{km.s}^{-3}$ )	Temps avant vibration et après ensemencement	Durée d'application du signal vibratoire	Temps après vibration	
Vertical	0,099	50	1	3,081	24h	5min	5min	
	0,005	100	0,19	1,171	24h	5min	5min	
	2,208E-04	1500	2	184,851	24h	5min	5min	
	4,769E-05	2500	1,2	184,851	24h	5min	5min	
Horizontal	0,696	50	7	21,566	24h	5min	5min	Amplitude constante (0,7mm)
	0,699	80	18	88,728	24h	5min	5min	
	0,696	100	28	172,528	24h	5min	5min	
	0,007	100	0,3	1,849	24h, 48h	5min, 30min	5min, 24h	Fréquence constante (100Hz)
	0,010	100	0,4	2,465	24h, 48h	5min, 30min	5min, 24h	
	0,045	100	1,8	11,091	24h, 48h	5min, 30min	5min, 24h	
	0,070	100	2,8	17,253	24h, 48h	5min, 30min	5min, 24h	
	0,199	100	8	49,294	24h, 48h	5min, 30min	5min, 24h	
	0,447	100	18	110,911	24h, 48h	5min, 30min	5min, 24h	
	0,696	100	28	172,528	24h, 48h	5min, 30min	5min, 24h	
	4,720E-05	1000	0,19	11,707	24h	5min	5min	Fréquence constante (1000Hz)
	0,001	1000	2,8	172,528	24h	5min	5min	
	0,000	1000	0,28	17,253	24h	5min	5min	
	5,564E-07	5000	0,056	17,253	24h	5min	5min	Fréquence constante (5000Hz)
	5,564E-06	5000	0,56	172,528	24h	5min	5min	
	0,696	100	28	172,528	24h	5min	5min	Jerk constant ( $173\text{km.s}^{-3}$ )
	0,032	280	10	172,528	24h	5min	5min	
	0,006	500	5,6	172,528	24h	5min	5min	
	0,001	1000	2,8	172,528	24h	5min	5min	
	2,567E-05	3000	0,93	171,911	24h	5min	5min	
5,564E-06	5000	0,56	172,528	24h	5min	5min		



**Figure 51: Schéma de fonctionnement simplifié de l'appareillage de vibration.**

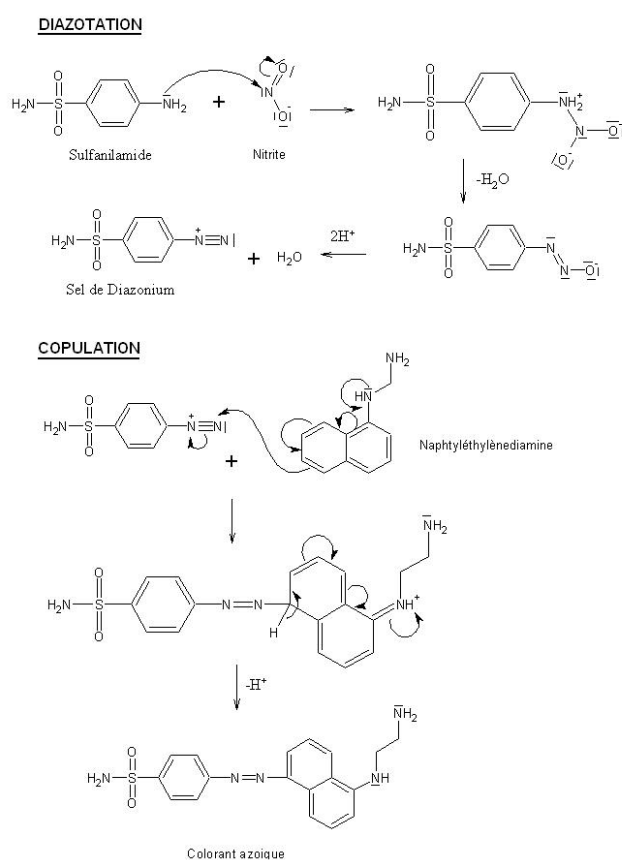
Le signal est généré par un fichier son placé sur ordinateur ou par l'intermédiaire d'un générateur de signal. L'un de ces deux appareils (selon le signal voulu) est relié à un amplificateur, lui-même relié au pot vibrant, mis en position horizontale ou verticale. Les signaux mécaniques sont alors transmis à cinq boîtes de culture de 35mm de diamètre, maintenues par un support métallique.

### **Dosages d'oxyde nitrique (NO):**

Afin d'effectuer les dosages de NO, nous avons utilisé le Griess reagent system (Promega, G2930). Le NO présent dans le milieu de culture (relargué par les cellules) est mesuré indirectement, car cette molécule, lorsqu'elle est sécrétée, ne persiste que quelques secondes en milieu aqueux (6-10s); elle est oxydée en différents produits ( $\text{NO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}^+$ ) dont l'élément final stable et non volatil est le nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ). C'est donc ce dernier qui est dosé dans ce test par une réaction de diazotisation décrite par Griess en 1879 (Figure 52).

Les réactifs sont composés de sulfanilamide (1% sulfanilamide, 5% acide phosphorique) et de N-1-Naphtyléthylènediamine Dihydrochloride (NED) (0,1% N-1-naphtyléthylènediamine dihydrochloride dilué dans l'eau). Ce système détecte le  $\text{NO}_2^-$  dans une grande variété de liquides biologiques et expérimentaux comme le plasma, le sérum, l'urine et les milieux de culture. Le sulfanilamide et le NED entrent en compétition pour le nitrite dans la réaction de Griess. Une meilleure sensibilité est donc permise par l'addition séquentielle des deux composants.

De façon brève, une gamme de référence en duplicata (50µL/puits) est d'abord préparée en effectuant 6 dilutions en série de la solution mère de nitrite à 0.1M fournie, permettant d'obtenir un échantillonnage de 1.56 à 100µM. La dernière série de puits est laissée vierge de nitrite, afin d'obtenir le point 0µM. Ensuite sont déposés 50µL d'échantillons dans les puits désirés, avant d'ajouter 50µL de la solution de sulfanilamide à tous les puits (échantillons et gamme de référence). Une incubation de 5-10min est effectuée à l'abri de la lumière à température ambiante, puis le NED (50µL/puits) est ajouté à tous les puits. Une nouvelle incubation de 5-10min est effectuée à l'abri de la lumière. Une coloration violette/magenta apparaît, due au colorant azoïque formé (Figure 52). L'absorbance est mesurée dans les 30min à 540nm par un lecteur multiplaque et les densités optiques des échantillons sont comparées à celles de la gamme de référence afin d'en établir la concentration en nitrites.



**Figure 52: Principe du dosage Griess.**

Une série de réaction chimique avec le nitrite aboutie à une coloration violette/magenta due à la formation d'un composé azoïque dont la DO est mesurée à 540nm.

## H. REFERENCES

- Aarden, E. M., Burger, E. H. and Nijweide, P. J.** (1994). Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem* **55**, 287-99.
- Aarden, E. M., Wassenaar, A. M., Alblas, M. J. and Nijweide, P. J.** (1996). Immunocytochemical demonstration of extracellular matrix proteins in isolated osteocytes. *Histochem Cell Biol* **106**, 495-501.
- Abbott, J. and Holtzer, H.** (1966). The loss of phenotypic traits by differentiated cells. 3. The reversible behavior of chondrocytes in primary cultures. *J Cell Biol* **28**, 473-87.
- Abercrombie, M., Heaysman, J. E. and Pegrum, S. M.** (1971). The locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of the leading lamella. *Exp Cell Res* **67**, 359-67.
- Adachi, T., Aonuma, Y., Tanaka, M., Hojo, M., Takano-Yamamoto, T. and Kamioka, H.** (2009). Calcium response in single osteocytes to locally applied mechanical stimulus: differences in cell process and cell body. *J Biomech* **42**, 1989-95.
- Aikawa, R., Nagai, T., Kudoh, S., Zou, Y., Tanaka, M., Tamura, M., Akazawa, H., Takano, H., Nagai, R. and Komuro, I.** (2002). Integrins play a critical role in mechanical stress-induced p38 MAPK activation. *Hypertension* **39**, 233-8.
- Ajubi, N. E., Klein-Nulend, J., Alblas, M. J., Burger, E. H. and Nijweide, P. J.** (1999). Signal transduction pathways involved in fluid flow-induced PGE2 production by cultured osteocytes. *Am J Physiol* **276**, E171-8.
- Akyuz, E., Braun, J. T., Brown, N. A. and Bachus, K. N.** (2006). Static versus dynamic loading in the mechanical modulation of vertebral growth. *Spine (Phila Pa 1976)* **31**, E952-8.
- Albiges-Rizo, C., Destaing, O., Fourcade, B., Planus, E. and Block, M. R.** (2009). Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes and focal adhesions. *J Cell Sci* **122**, 3037-49.
- Albinsson, S., Nordstrom, I. and Hellstrand, P.** (2004). Stretch of the vascular wall induces smooth muscle differentiation by promoting actin polymerization. *J Biol Chem* **279**, 34849-55.
- Aldridge, S. E., Lennard, T. W., Williams, J. R. and Birch, M. A.** (2005). Vascular endothelial growth factor receptors in osteoclast differentiation and function. *Biochem Biophys Res Commun* **335**, 793-8.
- Alexandrova, A. Y., Arnold, K., Schaub, S., Vasiliev, J. M., Meister, J. J., Bershadsky, A. D. and Verkhovsky, A. B.** (2008). Comparative dynamics of retrograde actin flow and focal adhesions: formation of nascent adhesions triggers transition from fast to slow flow. *PLoS One* **3**, e3234.
- Alwis, G., Linden, C., Ahlborg, H. G., Dencker, M., Gardsell, P. and Karlsson, M. K.** (2008). A 2-year school-based exercise programme in pre-pubertal boys induces skeletal benefits in lumbar spine. *Acta Paediatr* **97**, 1564-71.
- Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y. and Kaibuchi, K.** (1996). Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* **271**, 20246-9.
- Anada, T., Kumagai, T., Honda, Y., Masuda, T., Kamijo, R., Kamakura, S., Yoshihara, N., Kuriyagawa, T., Shimauchi, H. and Suzuki, O.** (2008). Dose-dependent osteogenic effect of octacalcium phosphate on mouse bone marrow stromal cells. *Tissue Eng Part A* **14**, 965-78.
- Anderson, H. C.** (1995). Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Orthop Relat Res*, 266-80.
- Anderson, R. G.** (1998). The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* **67**, 199-225.

- Anginot, A., Jurdic, P. and Mazzorana, M.** (2008). Ostéoclastes: origine et différenciation, *Traité des maladies métaboliques osseuses de l'adulte. Médecine-Sciences Flammarion*, 10-20.
- Anh, D. J., Dimai, H. P., Hall, S. L. and Farley, J. R.** (1998). Skeletal alkaline phosphatase activity is primarily released from human osteoblasts in an insoluble form, and the net release is inhibited by calcium and skeletal growth factors. *Calcif Tissue Int* **62**, 332-40.
- Anselme, K.** (2000). Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* **21**, 667-81.
- Anselme, K., Bigerelle, M., Noel, B., Dufresne, E., Judas, D., Iost, A. and Hardouin, P.** (2000). Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. *J Biomed Mater Res* **49**, 155-66.
- Anselme, K., Bigerelle, M., Noel, B., Iost, A. and Hardouin, P.** (2002). Effect of grooved titanium substratum on human osteoblastic cell growth. *J Biomed Mater Res* **60**, 529-40.
- Antonsson, E. K. and Mann, R. W.** (1985). The frequency content of gait. *J Biomech* **18**, 39-47.
- Arai, F., Miyamoto, T., Ohneda, O., Inada, T., Sudo, T., Brasel, K., Miyata, T., Anderson, D. M. and Suda, T.** (1999). Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) receptors. *J Exp Med* **190**, 1741-54.
- Aratyn-Schaus, Y. and Gardel, M. L.** (2008). Biophysics. Clutch dynamics. *Science* **322**, 1646-7.
- Ariyoshi, W., Takahashi, T., Kanno, T., Ichimiya, H., Shinmyozu, K., Takano, H., Koseki, T. and Nishihara, T.** (2008). Heparin inhibits osteoclastic differentiation and function. *J Cell Biochem* **103**, 1707-17.
- Arnsdorf, E. J., Tummala, P., Kwon, R. Y. and Jacobs, C. R.** (2009). Mechanically induced osteogenic differentiation--the role of RhoA, ROCKII and cytoskeletal dynamics. *J Cell Sci* **122**, 546-53.
- Arriemerlou, C. and Meyer, T.** (2005). A local coupling model and compass parameter for eukaryotic chemotaxis. *Dev Cell* **8**, 215-27.
- Askari, J. A., Buckley, P. A., Mould, A. P. and Humphries, M. J.** (2009). Linking integrin conformation to function. *J Cell Sci* **122**, 165-70.
- Bacabac, R. G., Mizuno, D., Schmidt, C. F., MacKintosh, F. C., Van Loon, J. J., Klein-Nulend, J. and Smit, T. H.** (2008). Round versus flat: bone cell morphology, elasticity, and mechanosensing. *J Biomech* **41**, 1590-8.
- Bacabac, R. G., Smit, T. H., Mullender, M. G., Dijcks, S. J., Van Loon, J. J. and Klein-Nulend, J.** (2004). Nitric oxide production by bone cells is fluid shear stress rate dependent. *Biochem Biophys Res Commun* **315**, 823-9.
- Bacabac, R. G., Smit, T. H., Van Loon, J. J., Doulabi, B. Z., Helder, M. and Klein-Nulend, J.** (2006). Bone cell responses to high-frequency vibration stress: does the nucleus oscillate within the cytoplasm? *Faseb J* **20**, 858-64.
- Bachle, M. and Kohal, R. J.** (2004). A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells. *Clin Oral Implants Res* **15**, 683-92.
- Bakker, A. D., Klein-Nulend, J. and Burger, E. H.** (2003). Mechanotransduction in bone cells proceeds via activation of COX-2, but not COX-1. *Biochem Biophys Res Commun* **305**, 677-83.
- Bala, Y., Farlay, D., Delmas, P. D., Meunier, P. J. and Boivin, G.** (2009). Time sequence of secondary mineralization and microhardness in cortical and cancellous bone from ewes. *Bone*.

## H. REFERENCES

- Balcerzak, M., Pikula, S. and Buchet, R.** (2006). Phosphorylation-dependent phospholipase D activity of matrix vesicles. *FEBS Lett* **580**, 5676-80.
- Ball, M., Grant, D. M., Lo, W. J. and Scotchford, C. A.** (2008). The effect of different surface morphology and roughness on osteoblast-like cells. *J Biomed Mater Res A* **86**, 637-47.
- Ballanti, P., Minisola, S., Pacitti, M. T., Scarnecchia, L., Rosso, R., Mazzuoli, G. F. and Bonucci, E.** (1997). Tartrate-resistant acid phosphate activity as osteoclastic marker: sensitivity of cytochemical assessment and serum assay in comparison with standardized osteoclast histomorphometry. *Osteoporos Int* **7**, 39-43.
- Ballestrem, C., Wehrle-Haller, B., Hinz, B. and Imhof, B. A.** (2000). Actin-dependent lamellipodia formation and microtubule-dependent tail retraction control-directed cell migration. *Mol Biol Cell* **11**, 2999-3012.
- Banks, E., Nakajima, S., Shapiro, L. C., Tilevitz, O., Alonzo, J. R. and Chianelli, R. R.** (1977). Fibrous apatite grown on modified collagen. *Science* **198**, 1164-6.
- Beck, G. R., Jr.** (2003). Inorganic phosphate as a signaling molecule in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* **90**, 234-43.
- Beck, G. R., Jr., Moran, E. and Knecht, N.** (2003). Inorganic phosphate regulates multiple genes during osteoblast differentiation, including Nrf2. *Exp Cell Res* **288**, 288-300.
- Beck, G. R., Jr., Zerler, B. and Moran, E.** (2000). Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8352-7.
- Bellido, T., Ali, A. A., Gubrij, I., Plotkin, L. I., Fu, Q., O'Brien, C. A., Manolagas, S. C. and Jilka, R. L.** (2005). Chronic elevation of parathyroid hormone in mice reduces expression of sclerostin by osteocytes: a novel mechanism for hormonal control of osteoblastogenesis. *Endocrinology* **146**, 4577-83.
- Bellows, C. G., Aubin, J. E. and Heersche, J. N.** (1991). Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone Miner* **14**, 27-40.
- Ben-Nissan, B. and LeGeros, R.** (2008). Biologic and synthetic apatites. *Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering* **1**, 225-235.
- Bendall, A. J. and Abate-Shen, C.** (2000). Roles for Msx and Dlx homeoproteins in vertebrate development. *Gene* **247**, 17-31.
- Beningo, K. A., Dembo, M., Kaverina, I., Small, J. V. and Wang, Y. L.** (2001). Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts. *J Cell Biol* **153**, 881-8.
- Bennett, J. H., Carter, D. H., Alavi, A. L., Beresford, J. N. and Walsh, S.** (2001). Patterns of integrin expression in a human mandibular explant model of osteoblast differentiation. *Arch Oral Biol* **46**, 229-38.
- Benya, P. D. and Shaffer, J. D.** (1982). Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* **30**, 215-24.
- Bernards, M. T., Qin, C., Ratner, B. D. and Jiang, S.** (2008). Adhesion of MC3T3-E1 cells to bone sialoprotein and bone osteopontin specifically bound to collagen I. *J Biomed Mater Res A* **86**, 779-87.
- Bhadriraju, K., Elliott, J. T., Nguyen, M. and Plant, A. L.** (2007). Quantifying myosin light chain phosphorylation in single adherent cells with automated fluorescence microscopy. *BMC Cell Biol* **8**, 43.

## H. REFERENCES

- Block, M. R., Badowski, C., Millon-Fremillon, A., Bouvard, D., Bouin, A. P., Faurobert, E., Gerber-Scokaert, D., Planus, E. and Albiges-Rizo, C.** (2008). Podosome-type adhesions and focal adhesions, so alike yet so different. *Eur J Cell Biol* **87**, 491-506.
- Bodine, P. V., Vernon, S. K. and Komm, B. S.** (1996). Establishment and hormonal regulation of a conditionally transformed preosteocytic cell line from adult human bone. *Endocrinology* **137**, 4592-604.
- Bogaerts, A., Delecluse, C., Claessens, A. L., Coudyzer, W., Boonen, S. and Verschueren, S. M.** (2007). Impact of whole-body vibration training versus fitness training on muscle strength and muscle mass in older men: a 1-year randomized controlled trial. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **62**, 630-5.
- Boivin, G. and Meunier, P. J.** (2002). The degree of mineralization of bone tissue measured by computerized quantitative contact microradiography. *Calcif Tissue Int* **70**, 503-11.
- Bonewald, L. F. and Johnson, M. L.** (2008). Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone* **42**, 606-15.
- Bonfield, W.** (1988). Composites for bone replacement. *J Biomed Eng* **10**, 522-6.
- Bonfield, W., Grynepas, M. D., Tully, A. E., Bowman, J. and Abram, J.** (1981). Hydroxyapatite reinforced polyethylene--a mechanically compatible implant material for bone replacement. *Biomaterials* **2**, 185-6.
- Bosco, C., Iacovelli, M., Tsarpela, O., Cardinale, M., Bonifazi, M., Tihanyi, J., Viru, M., De Lorenzo, A. and Viru, A.** (2000). Hormonal responses to whole-body vibration in men. *Eur J Appl Physiol* **81**, 449-54.
- Boudot, C., Saidak, Z., Boulanouar, A. K., Petit, L., Gouilleux, F., Massy, Z., Brazier, M., Mentaverri, R. and Kamel, S.** (2010). Implication of the Calcium Sensing Receptor and the Phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in the extracellular calcium-mediated migration of RAW 264.7 osteoclast precursor cells. *Bone*.
- Boukhechba, F., Balaguer, T., Michiels, J. F., Ackermann, K., Quincey, D., Bouler, J. M., Pyerin, W., Carle, G. F. and Rochet, N.** (2009). Human primary osteocyte differentiation in a 3D culture system. *J Bone Miner Res* **24**, 1927-35.
- Bourrin, S., Palle, S., Pupier, R., Vico, L. and Alexandre, C.** (1995). Effect of physical training on bone adaptation in three zones of the rat tibia. *J Bone Miner Res* **10**, 1745-52.
- Boutahar, N., Guignandon, A., Vico, L. and Lafage-Proust, M. H.** (2004). Mechanical strain on osteoblasts activates autophosphorylation of focal adhesion kinase and proline-rich tyrosine kinase 2 tyrosine sites involved in ERK activation. *J Biol Chem* **279**, 30588-99.
- Bowers, K. T., Keller, J. C., Randolph, B. A., Wick, D. G. and Michaels, C. M.** (1992). Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants* **7**, 302-10.
- Boyan, B. D., Schwartz, Z., Lohmann, C. H., Sylvia, V. L., Cochran, D. L., Dean, D. D. and Puzas, J. E.** (2003). Pretreatment of bone with osteoclasts affects phenotypic expression of osteoblast-like cells. *J Orthop Res* **21**, 638-47.
- Boyde, A., Corsi, A., Quarto, R., Cancedda, R. and Bianco, P.** (1999). Osteoconduction in large macroporous hydroxyapatite ceramic implants: evidence for a complementary integration and disintegration mechanism. *Bone* **24**, 579-89.
- Brand, R. A., Stanford, C. M. and Nicoletta, D. P.** (2001). Primary adult human bone cells do not respond to tissue (continuum) level strains. *J Orthop Sci* **6**, 295-301.



## H. REFERENCES

- Brandi, M. L., Hukkanen, M., Umeda, T., Moradi-Bidhendi, N., Bianchi, S., Gross, S. S., Polak, J. M. and MacIntyre, I.** (1995). Bidirectional regulation of osteoclast function by nitric oxide synthase isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 2954-8.
- Brangwynne, C. P., MacKintosh, F. C., Kumar, S., Geisse, N. A., Talbot, J., Mahadevan, L., Parker, K. K., Ingber, D. E. and Weitz, D. A.** (2006). Microtubules can bear enhanced compressive loads in living cells because of lateral reinforcement. *J Cell Biol* **173**, 733-41.
- Brett, P. M., Harle, J., Salih, V., Mihoc, R., Olsen, I., Jones, F. H. and Tonetti, M.** (2004). Roughness response genes in osteoblasts. *Bone* **35**, 124-33.
- Brighton, C. T. and Hunt, R. M.** (1976). Histochemical localization of calcium in growth plate mitochondria and matrix vesicles. *Fed Proc* **35**, 143-7.
- Brighton, C. T., Strafford, B., Gross, S. B., Leatherwood, D. F., Williams, J. L. and Pollack, S. R.** (1991). The proliferative and synthetic response of isolated calvarial bone cells of rats to cyclic biaxial mechanical strain. *J Bone Joint Surg Am* **73**, 320-31.
- Brodland, G. W. and Gordon, R.** (1990). Intermediate filaments may prevent buckling of compressively loaded microtubules. *J Biomech Eng* **112**, 319-21.
- Browaeys, H., Bouvry, P. and De Bruyn, H.** (2007). A literature review on biomaterials in sinus augmentation procedures. *Clin Implant Dent Relat Res* **9**, 166-77.
- Brown, J. P., Delmas, P. D., Malaval, L., Edouard, C., Chapuy, M. C. and Meunier, P. J.** (1984). Serum bone Gla-protein: a specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis. *Lancet* **1**, 1091-3.
- Brown, T. D.** (2000). Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro: a review. *J Biomech* **33**, 3-14.
- Brunton, V. G., MacPherson, I. R. and Frame, M. C.** (2004). Cell adhesion receptors, tyrosine kinases and actin modulators: a complex three-way circuitry. *Biochim Biophys Acta* **1692**, 121-44.
- Bucay, N., Sarosi, I., Dunstan, C. R., Morony, S., Tarpley, J., Capparelli, C., Scully, S., Tan, H. L., Xu, W., Lacey, D. L. et al.** (1998). osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* **12**, 1260-8.
- Buckwalter, J. A. and Cooper, R. R.** (1987). Bone structure and function. *Instr Course Lect* **36**, 27-48.
- Burger, E. H. and Klein-Nulend, J.** (1999). Mechanotransduction in bone--role of the lacuno-canalicular network. *Faseb J* **13 Suppl**, S101-12.
- Burger, E. H., Klein-Nulend, J. and Veldhuijzen, J. P.** (1992). Mechanical stress and osteogenesis in vitro. *J Bone Miner Res* **7 Suppl 2**, S397-401.
- Canalis, E.** (2005). Mechanisms of glucocorticoid action in bone. *Curr Osteoporos Rep* **3**, 98-102.
- Candeliere, G. A., Liu, F. and Aubin, J. E.** (2001). Individual osteoblasts in the developing calvaria express different gene repertoires. *Bone* **28**, 351-61.
- Cardoso, L., Herman, B. C., Verborgt, O., Laudier, D., Majeska, R. J. and Schaffler, M. B.** (2008). Osteocyte Apoptosis Controls Activation of Intracortical Resorption in Response to Bone Fatigue. *J Bone Miner Res*.
- Carter, S. B.** (1965). Principles of cell motility: the direction of cell movement and cancer invasion. *Nature* **208**, 1183-7.

## H. REFERENCES

- Carvalho, R. S., Bumann, A., Schaffer, J. L. and Gerstenfeld, L. C.** (2002). Predominant integrin ligands expressed by osteoblasts show preferential regulation in response to both cell adhesion and mechanical perturbation. *J Cell Biochem* **84**, 497-508.
- Chambers, B., St Clair, S. F. and Froimson, M. I.** (2007). Hydroxyapatite-coated tapered cementless femoral components in total hip arthroplasty. *J Arthroplasty* **22**, 71-4.
- Chambers, T. J., Darby, J. A. and Fuller, K.** (1985). Mammalian collagenase predisposes bone surfaces to osteoclastic resorption. *Cell Tissue Res* **241**, 671-5.
- Chambers, T. J. and Fuller, K.** (1985). Bone cells predispose bone surfaces to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact. *J Cell Sci* **76**, 155-65.
- Chan, C. E. and Odde, D. J.** (2008). Traction dynamics of filopodia on compliant substrates. *Science* **322**, 1687-91.
- Chang, K., Chang, W. H., Tsai, M. T. and Shih, C.** (2006). Pulsed electromagnetic fields accelerate apoptotic rate in osteoclasts. *Connect Tissue Res* **47**, 222-8.
- Chang, Y. C., Nalbant, P., Birkenfeld, J., Chang, Z. F. and Bokoch, G. M.** (2008). GEF-H1 couples nocodazole-induced microtubule disassembly to cell contractility via RhoA. *Mol Biol Cell* **19**, 2147-53.
- Chen, C. S. and Ingber, D. E.** (1999). Tensegrity and mechanoregulation: from skeleton to cytoskeleton. *Osteoarthritis Cartilage* **7**, 81-94.
- Chen, C. S., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G. M. and Ingber, D. E.** (1997). Geometric control of cell life and death. *Science* **276**, 1425-8.
- Chen, M., Liang, X., Wen, Y., Bai, B. J., Huang, M. L. and Gao, W. M.** (2007). [Fluid shear stress increases the Ca<sup>2+</sup> concentration in bone-marrow derived osteoclast-like cells]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* **25**, 412-4.
- Chen, Y., Mak, A. F., Wang, M., Li, J. S. and Wong, M. S.** (2008). In vitro behavior of osteoblast-like cells on PLLA films with a biomimetic apatite or apatite/collagen composite coating. *J Mater Sci Mater Med* **19**, 2261-8.
- Cheung, W. H., Mok, H. W., Qin, L., Sze, P. C., Lee, K. M. and Leung, K. S.** (2007). High-frequency whole-body vibration improves balancing ability in elderly women. *Arch Phys Med Rehabil* **88**, 852-7.
- Chhabra, E. S. and Higgs, H. N.** (2007). The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat Cell Biol* **9**, 1110-21.
- Choi, C. K., Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L. A., Mogilner, A. and Horwitz, A. R.** (2008). Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat Cell Biol* **10**, 1039-50.
- Choquet, D., Felsenfeld, D. P. and Sheetz, M. P.** (1997). Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. *Cell* **88**, 39-48.
- Chou, Y. F., Dunn, J. C. and Wu, B. M.** (2005a). In vitro response of MC3T3-E1 pre-osteoblasts within three-dimensional apatite-coated PLGA scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **75**, 81-90.
- Chou, Y. F., Huang, W., Dunn, J. C., Miller, T. A. and Wu, B. M.** (2005b). The effect of biomimetic apatite structure on osteoblast viability, proliferation, and gene expression. *Biomaterials* **26**, 285-95.
- Chow, J. W. and Chambers, T. J.** (1994). Indomethacin has distinct early and late actions on bone formation induced by mechanical stimulation. *Am J Physiol* **267**, E287-92.

## H. REFERENCES

- Chow, J. W., Fox, S., Jagger, C. J. and Chambers, T. J.** (1998). Role for parathyroid hormone in mechanical responsiveness of rat bone. *Am J Physiol* **274**, E146-54.
- Christiansen, B. A. and Silva, M. J.** (2006). The effect of varying magnitudes of whole-body vibration on several skeletal sites in mice. *Ann Biomed Eng* **34**, 1149-56.
- Church, S. M., Cotter, D., Bramon, E. and Murray, R. M.** (2002). Does schizophrenia result from developmental or degenerative processes? *J Neural Transm Suppl*, 129-47.
- Civitelli, R.** (2008). Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. *Arch Biochem Biophys* **473**, 188-92.
- Clark, K., Langeslag, M., Figdor, C. G. and van Leeuwen, F. N.** (2007). Myosin II and mechanotransduction: a balancing act. *Trends Cell Biol* **17**, 178-86.
- Colombelli, J., Besser, A., Kress, H., Reynaud, E. G., Girard, P., Caussin, E., Haselmann, U., Small, J. V., Schwarz, U. S. and Stelzer, E. H.** (2009). Mechanosensing in actin stress fibers revealed by a close correlation between force and protein localization. *J Cell Sci* **122**, 1665-79.
- Conroy, B. P., Kraemer, W. J., Maresh, C. M., Fleck, S. J., Stone, M. H., Fry, A. C., Miller, P. D. and Dalsky, G. P.** (1993). Bone mineral density in elite junior Olympic weightlifters. *Med Sci Sports Exerc* **25**, 1103-9.
- Corey, D. P., Garcia-Anoveros, J., Holt, J. R., Kwan, K. Y., Lin, S. Y., Vollrath, M. A., Amalfitano, A., Cheung, E. L., Derfler, B. H., Duggan, A. et al.** (2004). TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature* **432**, 723-30.
- Corsi, A., Xu, T., Chen, X. D., Boyde, A., Liang, J., Mankani, M., Sommer, B., Iozzo, R. V., Eichstetter, I., Robey, P. G. et al.** (2002). Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues. *J Bone Miner Res* **17**, 1180-9.
- Coulombe, P. A., Bousquet, O., Ma, L., Yamada, S. and Wirtz, D.** (2000). The 'ins' and 'outs' of intermediate filament organization. *Trends Cell Biol* **10**, 420-8.
- Cowin, S. C., Moss-Salentijn, L. and Moss, M. L.** (1991). Candidates for the mechanosensory system in bone. *J Biomech Eng* **113**, 191-7.
- Cowin, S. C. and Weinbaum, S.** (1998). Strain amplification in the bone mechanosensory system. *Am J Med Sci* **316**, 184-8.
- Cucina, A., Sterpetti, A. V., Pupelis, G., Fragale, A., Lepidi, S., Cavallaro, A., Giustiniani, Q. and Santoro D'Angelo, L.** (1995). Shear stress induces changes in the morphology and cytoskeleton organisation of arterial endothelial cells. *Eur J Vasc Endovasc Surg* **9**, 86-92.
- Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D. R. and Yamada, K. M.** (2001). Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* **294**, 1708-12.
- Cullen, D. M., Smith, R. T. and Akhter, M. P.** (2001). Bone-loading response varies with strain magnitude and cycle number. *J Appl Physiol* **91**, 1971-6.
- Dalby, M. J., Di Silvio, L., Gurav, N., Annaz, B., Kayser, M. V. and Bonfield, W.** (2002a). Optimizing HAPEX topography influences osteoblast response. *Tissue Eng* **8**, 453-67.
- Dalby, M. J., Di Silvio, L., Harper, E. J. and Bonfield, W.** (2001). Initial interaction of osteoblasts with the surface of a hydroxyapatite-poly(methylmethacrylate) cement. *Biomaterials* **22**, 1739-47.
- Dalby, M. J., Di Silvio, L., Harper, E. J. and Bonfield, W.** (2002b). Increasing hydroxyapatite incorporation into poly(methylmethacrylate) cement increases osteoblast adhesion and response. *Biomaterials* **23**, 569-76.

## H. REFERENCES

- Dalby, M. J., Gadegaard, N., Riehle, M. O., Wilkinson, C. D. and Curtis, A. S.** (2004). Investigating filopodia sensing using arrays of defined nano-pits down to 35 nm diameter in size. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 2005-15.
- Dalby, M. J., McCloy, D., Robertson, M., Wilkinson, C. D. and Oreffo, R. O.** (2006). Osteoprogenitor response to defined topographies with nanoscale depths. *Biomaterials* **27**, 1306-15.
- Dallas, S. L., Veno, P. A., Rosser, J. L., Barragan-Adjemian, C., Rowe, D. W., Kalajzic, I. and Bonewald, L. F.** (2009). Time lapse imaging techniques for comparison of mineralization dynamics in primary murine osteoblasts and the late osteoblast/early osteocyte-like cell line MLO-A5. *Cells Tissues Organs* **189**, 6-11.
- Danowski, B. A.** (1989). Fibroblast contractility and actin organization are stimulated by microtubule inhibitors. *J Cell Sci* **93 (Pt 2)**, 255-66.
- Davenport, R. W., Dou, P., Rehder, V. and Kater, S. B.** (1993). A sensory role for neuronal growth cone filopodia. *Nature* **361**, 721-4.
- David, V., Martin, A., Lafage-Proust, M. H., Malaval, L., Peyroche, S., Jones, D. B., Vico, L. and Guignandon, A.** (2007). Mechanical loading down-regulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma in bone marrow stromal cells and favors osteoblastogenesis at the expense of adipogenesis. *Endocrinology* **148**, 2553-62.
- Deckers, M. M., Karperien, M., van der Bent, C., Yamashita, T., Papapoulos, S. E. and Lowik, C. W.** (2000). Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology* **141**, 1667-74.
- DeMali, K. A. and Burridge, K.** (2003). Coupling membrane protrusion and cell adhesion. *J Cell Sci* **116**, 2389-97.
- Denaro, V., Cittadini, A., Barnaba, S. A., Ruzzini, L., Denaro, L., Rettino, A., De Paola, B., Papapietro, N. and Sgambato, A.** (2008). Static electromagnetic fields generated by corrosion currents inhibit human osteoblast differentiation. *Spine (Phila Pa 1976)* **33**, 955-9.
- Destaing, O., Saltel, F., Gilquin, B., Chabadel, A., Khochbin, S., Ory, S. and Jurdic, P.** (2005). A novel Rho-mDia2-HDAC6 pathway controls podosome patterning through microtubule acetylation in osteoclasts. *J Cell Sci* **118**, 2901-11.
- Devogelaer, J. P., De Cooman, S. and Nagant de Deuxchaisnes, C.** (1992). Low bone mass in hypogonadal males. Effect of testosterone substitution therapy, a densitometric study. *Maturitas* **15**, 17-23.
- Di Silvio, L., Dalby, M. J. and Bonfield, W.** (2002). Osteoblast behaviour on HA/PE composite surfaces with different HA volumes. *Biomaterials* **23**, 101-7.
- Diaz-Flores, L., Gutierrez, R., Madrid, J. F., Varela, H., Valladares, F., Acosta, E., Martin-Vasallo, P. and Diaz-Flores, L., Jr.** (2009). Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histol Histopathol* **24**, 909-69.
- Dike, L. E., Chen, C. S., Mrksich, M., Tien, J., Whitesides, G. M. and Ingber, D. E.** (1999). Geometric control of switching between growth, apoptosis, and differentiation during angiogenesis using micropatterned substrates. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **35**, 441-8.
- Discher, D. E., Mooney, D. J. and Zandstra, P. W.** (2009). Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science* **324**, 1673-7.
- Dobnig, H. and Turner, R. T.** (1995). Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. *Endocrinology* **136**, 3632-8.

- Dodds, R. A., Connor, J. R., James, I. E., Rykaczewski, E. L., Appelbaum, E., Dul, E. and Gowen, M.** (1995). Human osteoclasts, not osteoblasts, deposit osteopontin onto resorption surfaces: an in vitro and ex vivo study of remodeling bone. *J Bone Miner Res* **10**, 1666-80.
- Doi, Y., Horiguchi, T., Moriwaki, Y., Kitago, H., Kajimoto, T. and Iwayama, Y.** (1996). Formation of apatite-collagen complexes. *J Biomed Mater Res* **31**, 43-9.
- Dominguez, R.** (2009). Actin filament nucleation and elongation factors--structure-function relationships. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **44**, 351-66.
- Domon, T., Suzuki, R., Takata, K., Yamazaki, Y., Takahashi, S., Yamamoto, T. and Wakita, M.** (2001). The nature and function of mononuclear cells on the resorbed surfaces of bone in the reversal phase during remodeling. *Ann Anat* **183**, 103-10.
- Donahue, H. J.** (2000). Gap junctions and biophysical regulation of bone cell differentiation. *Bone* **26**, 417-22.
- dos Remedios, C. G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I. V., Tsubakihara, M., Berry, D. A. and Nosworthy, N. J.** (2003). Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev* **83**, 433-73.
- Doyle, A. D., Wang, F. W., Matsumoto, K. and Yamada, K. M.** (2009). One-dimensional topography underlies three-dimensional fibrillar cell migration. *J Cell Biol* **184**, 481-90.
- Drake, F. H., Dodds, R. A., James, I. E., Connor, J. R., Debouck, C., Richardson, S., Lee-Rykaczewski, E., Coleman, L., Rieman, D., Barthlow, R. et al.** (1996). Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts. *J Biol Chem* **271**, 12511-6.
- Dubash, A. D., Menold, M. M., Samson, T., Boulter, E., Garcia-Mata, R., Doughman, R. and Burridge, K.** (2009). Chapter 1. Focal adhesions: new angles on an old structure. *Int Rev Cell Mol Biol* **277**, 1-65.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L. and Karsenty, G.** (1997). *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* **89**, 747-54.
- Dumas, V., Perrier, A., Malaval, L., Laroche, N., Guignandon, A., Vico, L. and Rattner, A.** (2009). The effect of dual frequency cyclic compression on matrix deposition by osteoblast-like cells grown in 3D scaffolds and on modulation of VEGF variant expression. *Biomaterials* **30**, 3279-88.
- Duncan, R. L. and Hruska, K. A.** (1994). Chronic, intermittent loading alters mechanosensitive channel characteristics in osteoblast-like cells. *Am J Physiol* **267**, F909-16.
- Duncan, R. L. and Turner, C. H.** (1995). Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int* **57**, 344-58.
- Durrieu, M. C., Pallu, S., Guillemot, F., Bareille, R., Amedee, J., Baquey, C. H., Labrugere, C. and Dard, M.** (2004). Grafting RGD containing peptides onto hydroxyapatite to promote osteoblastic cells adhesion. *J Mater Sci Mater Med* **15**, 779-86.
- El-Ghannam, A., Ducheyne, P. and Shapiro, I. M.** (1999). Effect of serum proteins on osteoblast adhesion to surface-modified bioactive glass and hydroxyapatite. *J Orthop Res* **17**, 340-5.
- Emsley, J., Knight, C. G., Farndale, R. W., Barnes, M. J. and Liddington, R. C.** (2000). Structural basis of collagen recognition by integrin  $\alpha2\beta1$ . *Cell* **101**, 47-56.
- Endlich, N., Kress, K. R., Reiser, J., Uttenweiler, D., Kriz, W., Mundel, P. and Endlich, K.** (2001). Podocytes respond to mechanical stress in vitro. *J Am Soc Nephrol* **12**, 413-22.
- Engler, A., Bacakova, L., Newman, C., Hategan, A., Griffin, M. and Discher, D.** (2004). Substrate compliance versus ligand density in cell on gel responses. *Biophys J* **86**, 617-28.

## H. REFERENCES

- Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L. and Discher, D. E.** (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* **126**, 677-89.
- Eschbach, L.** (2000). Nonresorbable polymers in bone surgery. *Injury* **31 Suppl 4**, 22-7.
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A.** (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-35.
- Evans, E. and Yeung, A.** (1989). Apparent viscosity and cortical tension of blood granulocytes determined by micropipet aspiration. *Biophys J* **56**, 151-60.
- Evans, F. G.** (1953). Methods of studying the biomechanical significance of bone form. *Am J Phys Anthropol* **11**, 413-35.
- Even-Ram, S., Doyle, A. D., Conti, M. A., Matsumoto, K., Adelstein, R. S. and Yamada, K. M.** (2007). Myosin IIA regulates cell motility and actomyosin-microtubule crosstalk. *Nat Cell Biol* **9**, 299-309.
- Evers, E. E., Zondag, G. C., Malliri, A., Price, L. S., ten Klooster, J. P., van der Kammen, R. A. and Collard, J. G.** (2000). Rho family proteins in cell adhesion and cell migration. *Eur J Cancer* **36**, 1269-74.
- Everts, V., Delaisse, J. M., Korper, W., Jansen, D. C., Tigchelaar-Gutter, W., Saftig, P. and Beertsen, W.** (2002). The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res* **17**, 77-90.
- Ezratty, E. J., Bertaux, C., Marcantonio, E. E. and Gundersen, G. G.** (2009). Clathrin mediates integrin endocytosis for focal adhesion disassembly in migrating cells. *J Cell Biol* **187**, 733-47.
- Fall, P. M., Breault, D. T. and Raisz, L. G.** (1994). Inhibition of collagen synthesis by prostaglandins in the immortalized rat osteoblastic cell line Py1a: structure-activity relations and signal transduction mechanisms. *J Bone Miner Res* **9**, 1935-43.
- Fauli, R. J. and Ginsberg, M. H.** (1996). Inside-out signaling through integrins. *J Am Soc Nephrol* **7**, 1091-7.
- Faure, C., Linossier, M. T., Malaval, L., Lafage-Proust, M. H., Peyroche, S., Vico, L. and Guignandon, A.** (2008). Mechanical signals modulated vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) alternative splicing in osteoblastic cells through actin polymerisation. *Bone* **42**, 1092-101.
- Feng, J. Q., Huang, H., Lu, Y., Ye, L., Xie, Y., Tsutsui, T. W., Kunieda, T., Castranio, T., Scott, G., Bonewald, L. B. et al.** (2003). The Dentin matrix protein 1 (Dmp1) is specifically expressed in mineralized, but not soft, tissues during development. *J Dent Res* **82**, 776-80.
- Feng, J. Q., Ward, L. M., Liu, S., Lu, Y., Xie, Y., Yuan, B., Yu, X., Rauch, F., Davis, S. I., Zhang, S. et al.** (2006). Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nat Genet* **38**, 1310-5.
- Ferrara, N., Gerber, H. P. and LeCouter, J.** (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* **9**, 669-76.
- Flemming, W.** (1880). Beiträge zur Kenntniss der Zelle und ihrer Lebenserscheinungen, Theil II. Arch für Mikros Anat 18:151-259; Piternick L., translator, 1965. Contribution to the knowledge of the cell and its vital processes. *J Cell Biol* **25-II**, 1-69.
- Folkman, J. and Moscona, A.** (1978). Role of cell shape in growth control. *Nature* **273**, 345-9.
- Follet, H., Boivin, G., Rumelhart, C. and Meunier, P. J.** (2004). The degree of mineralization is a determinant of bone strength: a study on human calcanei. *Bone* **34**, 783-9.

## H. REFERENCES

- Foth, B. J., Goedecke, M. C. and Soldati, D.** (2006). New insights into myosin evolution and classification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 3681-6.
- Fox, S. W., Chambers, T. J. and Chow, J. W.** (1996). Nitric oxide is an early mediator of the increase in bone formation by mechanical stimulation. *Am J Physiol* **270**, E955-60.
- Fox, S. W. and Chow, J. W.** (1998). Nitric oxide synthase expression in bone cells. *Bone* **23**, 1-6.
- Franceschi, R. T., Xiao, G., Jiang, D., Gopalakrishnan, R., Yang, S. and Reith, E.** (2003). Multiple signaling pathways converge on the Cbfa1/Runx2 transcription factor to regulate osteoblast differentiation. *Connect Tissue Res* **44 Suppl 1**, 109-16.
- Franz-Odenaal, T. A., Hall, B. K. and Witten, P. E.** (2006). Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn* **235**, 176-90.
- Friedenstein, A. Y.** (1968). Induction of bone tissue by transitional epithelium. *Clin Orthop Relat Res* **59**, 21-37.
- Friedman, R. J., Bauer, T. W., Garg, K., Jiang, M., An, Y. H. and Draughn, R. A.** (1995). Histological and mechanical comparison of hydroxyapatite-coated cobalt-chrome and titanium implants in the rabbit femur. *J Appl Biomater* **6**, 231-5.
- Fritton, S. P., McLeod, K. J. and Rubin, C. T.** (2000). Quantifying the strain history of bone: spatial uniformity and self-similarity of low-magnitude strains. *J Biomech* **33**, 317-25.
- Fritton, S. P. and Rubin, C. T.** (2001). In vivo measurement of bone deformations using strain gauges. In: Cowin SC, eds. *Bone mechanics handbook*. Boca Raton, FL: CRC Press **8-10-8-34**.
- Frixione, E.** (2000). Recurring views on the structure and function of the cytoskeleton: a 300-year epic. *Cell Motil Cytoskeleton* **46**, 73-94.
- Frost, H. M.** (1964). The laws of bone structure. *Springfield, Charles, C. Thomas*.
- Frost, H. M.** (1987). Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal. *Anat Rec* **219**, 1-9.
- Fujiwara, I., Takahashi, S., Tadakuma, H., Funatsu, T. and Ishiwata, S.** (2002). Microscopic analysis of polymerization dynamics with individual actin filaments. *Nat Cell Biol* **4**, 666-73.
- Fuller, B.** (1961). Tensegrity. *Portfolio Artnews Annual* **4**, 112-127.
- Fuller, K. and Chambers, T. J.** (1987). Generation of osteoclasts in cultures of rabbit bone marrow and spleen cells. *J Cell Physiol* **132**, 441-52.
- Gail, M. H. and Boone, C. W.** (1970). The locomotion of mouse fibroblasts in tissue culture. *Biophys J* **10**, 980-93.
- Garcia-Lopez, S., Meikle, M. C., Villanueva, R. E., Montano, L., Masso, F., Ramirez-Amador, V. and Bojalil, R.** (2005). Mechanical deformation inhibits IL-10 and stimulates IL-12 production by mouse calvarial osteoblasts in vitro. *Arch Oral Biol* **50**, 449-52.
- Gavara, N., Roca-Cusachs, P., Sunyer, R., Farre, R. and Navajas, D.** (2008). Mapping cell-matrix stresses during stretch reveals inelastic reorganization of the cytoskeleton. *Biophys J* **95**, 464-71.
- Geiger, B. and Bershadsky, A.** (2002). Exploring the neighborhood: adhesion-coupled cell mechanosensors. *Cell* **110**, 139-42.
- Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R. and Yamada, K. M.** (2001). Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 793-805.

## H. REFERENCES

- Geiger, B., Spatz, J. P. and Bershadsky, A. D.** (2009). Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 21-33.
- Geiger, T. R. and Peeper, D. S.** (2009). Metastasis mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1796**, 293-308.
- Gerber, H. P., Vu, T. H., Ryan, A. M., Kowalski, J., Werb, Z. and Ferrara, N.** (1999). VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* **5**, 623-8.
- Ghosh, K., Thodeti, C. K., Dudley, A. C., Mammoto, A., Klagsbrun, M. and Ingber, D. E.** (2008). Tumor-derived endothelial cells exhibit aberrant Rho-mediated mechanosensing and abnormal angiogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 11305-10.
- Giannone, G., Dubin-Thaler, B. J., Rossier, O., Cai, Y., Chaga, O., Jiang, G., Beaver, W., Dobereiner, H. G., Freund, Y., Borisy, G. et al.** (2007). Lamellipodial actin mechanically links myosin activity with adhesion-site formation. *Cell* **128**, 561-75.
- Giannone, G., Mege, R. M. and Thoumine, O.** (2009). Multi-level molecular clutches in motile cell processes. *Trends Cell Biol* **19**, 475-86.
- Giuliano, K. A. and Taylor, D. L.** (1990). Formation, transport, contraction, and disassembly of stress fibers in fibroblasts. *Cell Motil Cytoskeleton* **16**, 14-21.
- Glimcher, M. J.** (1987). The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification. *Instr Course Lect* **36**, 49-69.
- Glimcher, M. J.** (1989). Mechanism of calcification: role of collagen fibrils and collagen-phosphoprotein complexes in vitro and in vivo. *Anat Rec* **224**, 139-53.
- Globus, R. K., Doty, S. B., Lull, J. C., Holmuhamedov, E., Humphries, M. J. and Damsky, C. H.** (1998). Fibronectin is a survival factor for differentiated osteoblasts. *J Cell Sci* **111 (Pt 10)**, 1385-93.
- Goldberg, D. J. and Burmeister, D. W.** (1992). Microtubule-based filopodium-like protrusions form after axotomy. *J Neurosci* **12**, 4800-7.
- Goldman, R. D., Khuon, S., Chou, Y. H., Opal, P. and Steinert, P. M.** (1996). The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *J Cell Biol* **134**, 971-83.
- Gordon, J. A., Tye, C. E., Sampaio, A. V., Underhill, T. M., Hunter, G. K. and Goldberg, H. A.** (2007). Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *Bone* **41**, 462-73.
- Graham, S., Hammond-Jones, D., Gamie, Z., Polyzois, I., Tsiridis, E. and Tsiridis, E.** (2008). The effect of beta-blockers on bone metabolism as potential drugs under investigation for osteoporosis and fracture healing. *Expert Opin Investig Drugs* **17**, 1281-99.
- Granhed, H., Jonson, R. and Hansson, T.** (1987). The loads on the lumbar spine during extreme weight lifting. *Spine (Phila Pa 1976)* **12**, 146-9.
- Gray, C., Boyde, A. and Jones, S. J.** (1996). Topographically induced bone formation in vitro: implications for bone implants and bone grafts. *Bone* **18**, 115-23.
- Grigoriadis, A. E., Wang, Z. Q., Cecchini, M. G., Hofstetter, W., Felix, R., Fleisch, H. A. and Wagner, E. F.** (1994). c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science* **266**, 443-8.
- Grinnell, F., Ho, C. H., Tamariz, E., Lee, D. J. and Skuta, G.** (2003). Dendritic fibroblasts in three-dimensional collagen matrices. *Mol Biol Cell* **14**, 384-95.



## H. REFERENCES

- Gross, S. S. and Wolin, M. S.** (1995). Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol* **57**, 737-69.
- Guharay, F. and Sachs, F.** (1984). Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle. *J Physiol* **352**, 685-701.
- Gunst, S. J., Tang, D. D. and Opazo Saez, A.** (2003). Cytoskeletal remodeling of the airway smooth muscle cell: a mechanism for adaptation to mechanical forces in the lung. *Respir Physiol Neurobiol* **137**, 151-68.
- Habibovic, P., Sees, T. M., van den Doel, M. A., van Blitterswijk, C. A. and de Groot, K.** (2006). Osteoinduction by biomaterials--physicochemical and structural influences. *J Biomed Mater Res A* **77**, 747-62.
- Hadjidakis, D. J. and Androulakis, II.** (2006). Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci* **1092**, 385-96.
- Haga, H., Sasaki, S., Kawabata, K., Ito, E., Ushiki, T. and Sambongi, T.** (2000). Elasticity mapping of living fibroblasts by AFM and immunofluorescence observation of the cytoskeleton. *Ultramicroscopy* **82**, 253-8.
- Han, Y., Cowin, S. C., Schaffler, M. B. and Weinbaum, S.** (2004). Mechanotransduction and strain amplification in osteocyte cell processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16689-94.
- Hanagata, N., Takemura, T., Monkawa, A., Ikoma, T. and Tanaka, J.** (2007). Phenotype and gene expression pattern of osteoblast-like cells cultured on polystyrene and hydroxyapatite with pre-adsorbed type-I collagen. *J Biomed Mater Res A* **83**, 362-71.
- Harada, S., Rodan, S. B. and Rodan, G. A.** (1995). Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in osteoblasts. *Clin Orthop Relat Res*, 76-80.
- Harter, L. V., Hruska, K. A. and Duncan, R. L.** (1995). Human osteoblast-like cells respond to mechanical strain with increased bone matrix protein production independent of hormonal regulation. *Endocrinology* **136**, 528-35.
- Hatakeyama, J., Hatakeyama, Y., Takahashi, I., Suzuki, O. and Sasano, Y.** (2007). Proliferation and adhesion of periodontal ligament cells on synthetic biominerals. *Oral Dis* **13**, 500-6.
- Hatano, K., Inoue, H., Kojo, T., Matsunaga, T., Tsujisawa, T., Uchiyama, C. and Uchida, Y.** (1999). Effect of surface roughness on proliferation and alkaline phosphatase expression of rat calvarial cells cultured on polystyrene. *Bone* **25**, 439-45.
- Hathaway, D. R. and Adelstein, R. S.** (1979). Human platelet myosin light chain kinase requires the calcium-binding protein calmodulin for activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 1653-7.
- Hauge, E. M., Qvesel, D., Eriksen, E. F., Mosekilde, L. and Melsen, F.** (2001). Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. *J Bone Miner Res* **16**, 1575-82.
- Heino, T. J., Kurata, K., Higaki, H. and Vaananen, H. K.** (2009). Evidence for the role of osteocytes in the initiation of targeted remodeling. *Technol Health Care* **17**, 49-56.
- Helfand, B. T., Chang, L. and Goldman, R. D.** (2004). Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture. *J Cell Sci* **117**, 133-41.
- Helfrich, M. H., Evans, D. E., Grabowski, P. S., Pollock, J. S., Ohshima, H. and Ralston, S. H.** (1997). Expression of nitric oxide synthase isoforms in bone and bone cell cultures. *J Bone Miner Res* **12**, 1108-15.
- Hernandez, C. J., Beaupre, G. S. and Carter, D. R.** (2000). A model of mechanobiologic and metabolic influences on bone adaptation. *J Rehabil Res Dev* **37**, 235-44.

## H. REFERENCES

- Hill, P. A.** (1998). Bone remodelling. *Br J Orthod* **25**, 101-7.
- Hirao, M., Hashimoto, J., Yamasaki, N., Ando, W., Tsuboi, H., Myoui, A. and Yoshikawa, H.** (2007). Oxygen tension is an important mediator of the transformation of osteoblasts to osteocytes. *J Bone Miner Metab* **25**, 266-76.
- Hirokawa, N.** (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* **279**, 519-26.
- Holtzer, H., Abbott, J., Lash, J. and Holtzer, S.** (1960). The Loss Of Phenotypic Traits By Differentiated Cells In Vitro, I. Dedifferentiation Of Cartilage Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **46**, 1533-42.
- Howard, J. and Hyman, A. A.** (2003). Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature* **422**, 753-8.
- Hsieh, Y. F. and Turner, C. H.** (2001). Effects of loading frequency on mechanically induced bone formation. *J Bone Miner Res* **16**, 918-24.
- Hsu, F. Y., Tsai, S. W., Lan, C. W. and Wang, Y. J.** (2005). An in vivo study of a bone grafting material consisting of hydroxyapatite and reconstituted collagen. *J Mater Sci Mater Med* **16**, 341-5.
- Hsu, H., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Solovyev, I., Colombero, A., Timms, E., Tan, H. L., Elliott, G., Kelley, M. J., Sarosi, I. et al.** (1999). Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3540-5.
- Hu, H., Hilton, M. J., Tu, X., Yu, K., Ornitz, D. M. and Long, F.** (2005). Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development* **132**, 49-60.
- Huang, C. H., Chen, M. H., Young, T. H., Jeng, J. H. and Chen, Y. J.** (2009a). Interactive effects of mechanical stretching and extracellular matrix proteins on initiating osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* **108**, 1263-73.
- Huang, C. H., Chen, M. H., Young, T. H., Jeng, J. H. and Chen, Y. J.** (2009b). Interactive effects of mechanical stretching and extracellular matrix proteins on initiating osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*.
- Huang, J. D., Brady, S. T., Richards, B. W., Stenolen, D., Resau, J. H., Copeland, N. G. and Jenkins, N. A.** (1999a). Direct interaction of microtubule- and actin-based transport motors. *Nature* **397**, 267-70.
- Huang, R. P., Rubin, C. T. and McLeod, K. J.** (1999b). Changes in postural muscle dynamics as a function of age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **54**, B352-7.
- Huang, S., Chen, C. S. and Ingber, D. E.** (1998). Control of cyclin D1, p27(Kip1), and cell cycle progression in human capillary endothelial cells by cell shape and cytoskeletal tension. *Mol Biol Cell* **9**, 3179-93.
- Huang, S. and Ingber, D. E.** (2000). Shape-dependent control of cell growth, differentiation, and apoptosis: switching between attractors in cell regulatory networks. *Exp Cell Res* **261**, 91-103.
- Huber, M., Reinisch, G., Trettenhahn, G., Zweymuller, K. and Lintner, F.** (2009). Presence of corrosion products and hypersensitivity-associated reactions in periprosthetic tissue after aseptic loosening of total hip replacements with metal bearing surfaces. *Acta Biomater* **5**, 172-80.
- Hubmayr, R. D., Shore, S. A., Fredberg, J. J., Planus, E., Panettieri, R. A., Jr., Moller, W., Heyder, J. and Wang, N.** (1996). Pharmacological activation changes stiffness of cultured human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol* **271**, C1660-8.

## H. REFERENCES

- Hunter, G. K., Hauschka, P. V., Poole, A. R., Rosenberg, L. C. and Goldberg, H. A.** (1996). Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J* **317** (Pt 1), 59-64.
- Hyman, A. A., Salsler, S., Drechsel, D. N., Unwin, N. and Mitchison, T. J.** (1992). Role of GTP hydrolysis in microtubule dynamics: information from a slowly hydrolyzable analogue, GMPCPP. *Mol Biol Cell* **3**, 1155-67.
- Hynes, R. O.** (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673-87.
- Iezzi, G., Orlandi, S., Pecora, G. and Piattelli, A.** (2009). Histologic and histomorphometric evaluation of the bone response around a hydroxyapatite-coated implant retrieved after 15 years. *Int J Periodontics Restorative Dent* **29**, 99-105.
- Ingber, D.** (1991). Integrins as mechanochemical transducers. *Curr Opin Cell Biol* **3**, 841-8.
- Ingber, D. E.** (1993). Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *J Cell Sci* **104** (Pt 3), 613-27.
- Ingber, D. E.** (2003a). Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *J Cell Sci* **116**, 1157-73.
- Ingber, D. E.** (2003b). Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks. *J Cell Sci* **116**, 1397-408.
- Ingber, D. E.** (2005). Mechanical control of tissue growth: function follows form. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11571-2.
- Ingber, D. E.** (2006). Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *Faseb J* **20**, 811-27.
- Ingram, A. J., Ly, H., Thai, K., Kang, M. J. and Scholey, J. W.** (1999). Mesangial cell signaling cascades in response to mechanical strain and glucose. *Kidney Int* **56**, 1721-8.
- Irie, K., Ejiri, S., Sakakura, Y., Shibui, T. and Yajima, T.** (2008). Matrix mineralization as a trigger for osteocyte maturation. *J Histochem Cytochem* **56**, 561-7.
- Ishikawa, H., Bischoff, R. and Holtzer, H.** (1968). Mitosis and intermediate-sized filaments in developing skeletal muscle. *J Cell Biol* **38**, 538-55.
- Ismail, F. S., Rohanizadeh, R., Atwa, S., Mason, R. S., Ruys, A. J., Martin, P. J. and Bendavid, A.** (2006). The influence of surface chemistry and topography on the contact guidance of MG63 osteoblast cells. *J Mater Sci Mater Med*.
- Jacinto, A. and Wolpert, L.** (2001). Filopodia. *Curr Biol* **11**, R634.
- Jackson, R. A., Kumarasuriyar, A., Nurcombe, V. and Cool, S. M.** (2006). Long-term loading inhibits ERK1/2 phosphorylation and increases FGFR3 expression in MC3T3-E1 osteoblast cells. *J Cell Physiol* **209**, 894-904.
- Jager, I. and Fratzl, P.** (2000). Mineralized collagen fibrils: a mechanical model with a staggered arrangement of mineral particles. *Biophys J* **79**, 1737-46.
- Jaiswal, R. K., Jaiswal, N., Bruder, S. P., Mbalaviele, G., Marshak, D. R. and Pittenger, M. F.** (2000). Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **275**, 9645-52.
- Jarvinen, T. L., Pajamaki, I., Sievanen, H., Vuohelainen, T., Tuukkanen, J., Jarvinen, M. and Kannus, P.** (2003). Femoral neck response to exercise and subsequent deconditioning in young and adult rats. *J Bone Miner Res* **18**, 1292-9.

## H. REFERENCES

- Jay, D. G.** (2000). The clutch hypothesis revisited: ascribing the roles of actin-associated proteins in filopodial protrusion in the nerve growth cone. *J Neurobiol* **44**, 114-25.
- Jekir, M. G. and Donahue, H. J.** (2009). Gap junctions and osteoblast-like cell gene expression in response to fluid flow. *J Biomech Eng* **131**, 011005.
- Jiang, H. and Grinnell, F.** (2005). Cell-matrix entanglement and mechanical anchorage of fibroblasts in three-dimensional collagen matrices. *Mol Biol Cell* **16**, 5070-6.
- Jikko, A., Harris, S. E., Chen, D., Mendrick, D. L. and Damsky, C. H.** (1999). Collagen integrin receptors regulate early osteoblast differentiation induced by BMP-2. *J Bone Miner Res* **14**, 1075-83.
- Jimi, E., Akiyama, S., Tsurukai, T., Okahashi, N., Kobayashi, K., Udagawa, N., Nishihara, T., Takahashi, N. and Suda, T.** (1999). Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function. *J Immunol* **163**, 434-42.
- Jung, G. Y., Park, Y. J. and Han, J. S.** (2010). Effects of HA released calcium ion on osteoblast differentiation. *J Mater Sci Mater Med*.
- Jurado, C., Haserick, J. R. and Lee, J.** (2005). Slipping or gripping? Fluorescent speckle microscopy in fish keratocytes reveals two different mechanisms for generating a retrograde flow of actin. *Mol Biol Cell* **16**, 507-18.
- Kadow-Romacker, A., Hoffmann, J. E., Duda, G., Wildemann, B. and Schmidmaier, G.** (2009). Effect of mechanical stimulation on osteoblast- and osteoclast-like cells in vitro. *Cells Tissues Organs* **190**, 61-8.
- Kamioka, H., Honjo, T. and Takano-Yamamoto, T.** (2001). A three-dimensional distribution of osteocyte processes revealed by the combination of confocal laser scanning microscopy and differential interference contrast microscopy. *Bone* **28**, 145-9.
- Kamioka, H., Sugawara, Y., Honjo, T., Yamashiro, T. and Takano-Yamamoto, T.** (2004). Terminal differentiation of osteoblasts to osteocytes is accompanied by dramatic changes in the distribution of actin-binding proteins. *J Bone Miner Res* **19**, 471-8.
- Kamitakahara, M., Ohtsuki, C. and Miyazaki, T.** (2007). Coating of bone-like apatite for development of bioactive materials for bone reconstruction. *Biomed Mater* **2**, R17-23.
- Kamm, K. E. and Stull, J. T.** (1985). The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **25**, 593-620.
- Kannus, P., Haapasalo, H., Sankelo, M., Sievanen, H., Pasanen, M., Heinonen, A., Oja, P. and Vuori, I.** (1995). Effect of starting age of physical activity on bone mass in the dominant arm of tennis and squash players. *Ann Intern Med* **123**, 27-31.
- Kapur, S., Chen, S. T., Baylink, D. J. and Lau, K. H.** (2004). Extracellular signal-regulated kinase-1 and -2 are both essential for the shear stress-induced human osteoblast proliferation. *Bone* **35**, 525-34.
- Karageorgiou, V. and Kaplan, D.** (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* **26**, 5474-91.
- Karinkanta, S., Heinonen, A., Sievanen, H., Uusi-Rasi, K., Fogelholm, M. and Kannus, P.** (2009). Maintenance of exercise-induced benefits in physical functioning and bone among elderly women. *Osteoporos Int* **20**, 665-74.
- Karlsson, M. K., Johnell, O. and Obrant, K. J.** (1995). Is bone mineral density advantage maintained long-term in previous weight lifters? *Calcif Tissue Int* **57**, 325-8.

- Karsdal, M. A., Larsen, L., Engsig, M. T., Lou, H., Ferreras, M., Lochter, A., Delaisse, J. M. and Foged, N. T.** (2002). Matrix metalloproteinase-dependent activation of latent transforming growth factor-beta controls the conversion of osteoblasts into osteocytes by blocking osteoblast apoptosis. *J Biol Chem* **277**, 44061-7.
- Karsdal, M. A., Neutzsky-Wulff, A. V., Dziegiel, M. H., Christiansen, C. and Henriksen, K.** (2008). Osteoclasts secrete non-bone derived signals that induce bone formation. *Biochem Biophys Res Commun* **366**, 483-8.
- Kaspar, D., Seidl, W., Ignatius, A., Neidlinger-Wilke, C. and Claes, L.** (2000a). [In vitro cell behavior of human osteoblasts after physiological dynamic stretching]. *Orthopade* **29**, 85-90.
- Kaspar, D., Seidl, W., Neidlinger-Wilke, C., Ignatius, A. and Claes, L.** (2000b). Dynamic cell stretching increases human osteoblast proliferation and CICP synthesis but decreases osteocalcin synthesis and alkaline phosphatase activity. *J Biomech* **33**, 45-51.
- Kasten, T. P., Collin-Osdoby, P., Patel, N., Osdoby, P., Krukowski, M., Misko, T. P., Settle, S. L., Currie, M. G. and Nickols, G. A.** (1994). Potentiation of osteoclast bone-resorption activity by inhibition of nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3569-73.
- Kato, Y., Boskey, A., Spevak, L., Dallas, M., Hori, M. and Bonewald, L. F.** (2001). Establishment of an osteoid preosteocyte-like cell MLO-A5 that spontaneously mineralizes in culture. *J Bone Miner Res* **16**, 1622-33.
- Kato, Y., Windle, J. J., Koop, B. A., Mundy, G. R. and Bonewald, L. F.** (1997). Establishment of an osteocyte-like cell line, MLO-Y4. *J Bone Miner Res* **12**, 2014-23.
- Katsumi, A., Naoe, T., Matsushita, T., Kaibuchi, K. and Schwartz, M. A.** (2005). Integrin activation and matrix binding mediate cellular responses to mechanical stretch. *J Biol Chem* **280**, 16546-9.
- Katsumi, A., Orr, A. W., Tzima, E. and Schwartz, M. A.** (2004). Integrins in mechanotransduction. *J Biol Chem* **279**, 12001-4.
- Keller, J. C., Schneider, G. B., Stanford, C. M. and Kellogg, B.** (2003). Effects of implant microtopography on osteoblast cell attachment. *Implant Dent* **12**, 175-81.
- Kesavan, C., Mohan, S., Oberholtzer, S., Wergedal, J. E. and Baylink, D. J.** (2005). Mechanical loading-induced gene expression and BMD changes are different in two inbred mouse strains. *J Appl Physiol* **99**, 1951-7.
- Keselowsky, B. G., Collard, D. M. and Garcia, A. J.** (2004). Surface chemistry modulates focal adhesion composition and signaling through changes in integrin binding. *Biomaterials* **25**, 5947-54.
- Khatiwala, C. B., Kim, P. D., Peyton, S. R. and Putnam, A. J.** (2009). ECM compliance regulates osteogenesis by influencing MAPK signaling downstream of RhoA and ROCK. *J Bone Miner Res* **24**, 886-98.
- Khatiwala, C. B., Peyton, S. R., Metzke, M. and Putnam, A. J.** (2007). The regulation of osteogenesis by ECM rigidity in MC3T3-E1 cells requires MAPK activation. *J Cell Physiol* **211**, 661-72.
- Khatiwala, C. B., Peyton, S. R. and Putnam, A. J.** (2006). Intrinsic mechanical properties of the extracellular matrix affect the behavior of pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**, C1640-50.
- Kido, S., Kuriwaka-Kido, R., Imamura, T., Ito, Y., Inoue, D. and Matsumoto, T.** (2009). Mechanical stress induces Interleukin-11 expression to stimulate osteoblast differentiation. *Bone* **45**, 1125-32.
- Kieswetter, K., Schwartz, Z., Hummert, T. W., Cochran, D. L., Simpson, J., Dean, D. D. and Boyan, B. D.** (1996). Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG-63 cells. *J Biomed Mater Res* **32**, 55-63.

## H. REFERENCES

- Kilpadi, K. L., Chang, P. L. and Bellis, S. L.** (2001). Hydroxylapatite binds more serum proteins, purified integrins, and osteoblast precursor cells than titanium or steel. *J Biomed Mater Res* **57**, 258-67.
- Kim, C. H., You, L., Yellowley, C. E. and Jacobs, C. R.** (2006). Oscillatory fluid flow-induced shear stress decreases osteoclastogenesis through RANKL and OPG signaling. *Bone* **39**, 1043-7.
- Kim, H. W., Kim, H. E. and Salih, V.** (2005). Stimulation of osteoblast responses to biomimetic nanocomposites of gelatin-hydroxyapatite for tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* **26**, 5221-30.
- Kitahama, S., Gibson, M. A., Hatzinikolas, G., Hay, S., Kuliwaba, J. L., Evdokiou, A., Atkins, G. J. and Findlay, D. M.** (2000). Expression of fibrillins and other microfibril-associated proteins in human bone and osteoblast-like cells. *Bone* **27**, 61-7.
- Kizuki, T., Ohgaki, M., Ichinose, S., Nakamura, S., Hashimoto, K., Toda, Y., Yokogawa, Y. and Yamashita, K.** (2006). Specific response of osteoblast-like cells on hydroxyapatite layer containing serum protein. *J Mater Sci Mater Med* **17**, 859-67.
- Klein-Nulend, J., Semeins, C. M., Ajubi, N. E., Nijweide, P. J. and Burger, E. H.** (1995). Pulsating fluid flow increases nitric oxide (NO) synthesis by osteocytes but not periosteal fibroblasts—correlation with prostaglandin upregulation. *Biochem Biophys Res Commun* **217**, 640-8.
- Klein-Nulend, J., Veldhuijzen, J. P., van Strien, M. E., de Jong, M. and Burger, E. H.** (1990). Inhibition of osteoclastic bone resorption by mechanical stimulation in vitro. *Arthritis Rheum* **33**, 66-72.
- Kogianni, G., Mann, V. and Noble, B. S.** (2008). Apoptotic bodies convey activity capable of initiating osteoclastogenesis and localized bone destruction. *J Bone Miner Res* **23**, 915-27.
- Kokkinos, P. A., Zarkadis, I. K., Kletsas, D. and Deligianni, D. D.** (2009). Effects of physiological mechanical strains on the release of growth factors and the expression of differentiation marker genes in human osteoblasts growing on Ti-6Al-4V. *J Biomed Mater Res A* **90**, 387-95.
- Komori, T.** (2008). Regulation of bone development and maintenance by Runx2. *Front Biosci* **13**, 898-903.
- Kousteni, S., Almeida, M., Han, L., Bellido, T., Jilka, R. L. and Manolagas, S. C.** (2007). Induction of osteoblast differentiation by selective activation of kinase-mediated actions of the estrogen receptor. *Mol Cell Biol* **27**, 1516-30.
- Kovacs, M., Toth, J., Hetenyi, C., Malnasi-Csizmadia, A. and Sellers, J. R.** (2004). Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *J Biol Chem* **279**, 35557-63.
- Krishnan, V., Moore, T. L., Ma, Y. L., Helvering, L. M., Frolik, C. A., Valasek, K. M., Ducy, P. and Geiser, A. G.** (2003). Parathyroid hormone bone anabolic action requires Cbfa1/Runx2-dependent signaling. *Mol Endocrinol* **17**, 423-35.
- Kruyt, M. C., de Bruijn, J. D., Wilson, C. E., Oner, F. C., van Blitterswijk, C. A., Verbout, A. J. and Dhert, W. J.** (2003). Viable osteogenic cells are obligatory for tissue-engineered ectopic bone formation in goats. *Tissue Eng* **9**, 327-36.
- Kuboki, Y., Takita, H., Kobayashi, D., Tsuruga, E., Inoue, M., Murata, M., Nagai, N., Dohi, Y. and Ohgushi, H.** (1998). BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. *J Biomed Mater Res* **39**, 190-9.
- Kubota, T., Yamauchi, M., Onozaki, J., Sato, S., Suzuki, Y. and Sodek, J.** (1993). Influence of an intermittent compressive force on matrix protein expression by ROS 17/2.8 cells, with selective stimulation of osteopontin. *Arch Oral Biol* **38**, 23-30.
- Kühne, W.** (1864). Untersuchungen über des Protoplasma und die Contractilität. Leipzig: Engelmann.

## H. REFERENCES

**Kulik, T. J. and Alvarado, S. P.** (1993). Effect of stretch on growth and collagen synthesis in cultured rat and lamb pulmonary arterial smooth muscle cells. *J Cell Physiol* **157**, 615-24.

**Kumar, S., Maxwell, I. Z., Heisterkamp, A., Polte, T. R., Lele, T. P., Salanga, M., Mazur, E. and Ingber, D. E.** (2006). Viscoelastic retraction of single living stress fibers and its impact on cell shape, cytoskeletal organization, and extracellular matrix mechanics. *Biophys J* **90**, 3762-73.

**Kunda, P., Paglini, G., Quiroga, S., Kosik, K. and Caceres, A.** (2001). Evidence for the involvement of Tiam1 in axon formation. *J Neurosci* **21**, 2361-72.

**Kurata, K., Uemura, T., Nemoto, A., Tateishi, T., Murakami, T., Higaki, H., Miura, H. and Iwamoto, Y.** (2001). Mechanical strain effect on bone-resorbing activity and messenger RNA expressions of marker enzymes in isolated osteoclast culture. *J Bone Miner Res* **16**, 722-30.

**Lader, C. S. and Flanagan, A. M.** (1998). Prostaglandin E2, interleukin 1alpha, and tumor necrosis factor-alpha increase human osteoclast formation and bone resorption in vitro. *Endocrinology* **139**, 3157-64.

**Lai, H. C., Zhuang, L. F., Liu, X., Wieland, M., Zhang, Z. Y. and Zhang, Z. Y.** (2010). The influence of surface energy on early adherent events of osteoblast on titanium substrates. *J Biomed Mater Res A* **93**, 289-96.

**Landis, W. J., Hodgens, K. J., Arena, J., Song, M. J. and McEwen, B. F.** (1996). Structural relations between collagen and mineral in bone as determined by high voltage electron microscopic tomography. *Microsc Res Tech* **33**, 192-202.

**Landis, W. J. and Silver, F. H.** (2009). Mineral deposition in the extracellular matrices of vertebrate tissues: identification of possible apatite nucleation sites on type I collagen. *Cells Tissues Organs* **189**, 20-4.

**Langstaff, S., Sayer, M., Smith, T. J. and Pugh, S. M.** (2001). Resorbable bioceramics based on stabilized calcium phosphates. Part II: evaluation of biological response. *Biomaterials* **22**, 135-50.

**Lanyon, L. E.** (1973). Analysis of surface bone strain in the calcaneus of sheep during normal locomotion. Strain analysis of the calcaneus. *J Biomech* **6**, 41-9.

**Lanyon, L. E.** (1992). Control of bone architecture by functional load bearing. *J Bone Miner Res* **7 Suppl 2**, S369-75.

**Lanyon, L. E., Hampson, W. G., Goodship, A. E. and Shah, J. S.** (1975). Bone deformation recorded in vivo from strain gauges attached to the human tibial shaft. *Acta Orthop Scand* **46**, 256-68.

**Lanyon, L. E. and Rubin, C. T.** (1984). Static vs dynamic loads as an influence on bone remodelling. *J Biomech* **17**, 897-905.

**Lanyon, L. E. and Smith, R. N.** (1970). Bone strain in the tibia during normal quadrupedal locomotion. *Acta Orthop Scand* **41**, 238-48.

**Lauffenburger, D. A. and Horwitz, A. F.** (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* **84**, 359-69.

**Le Guillou-Buffello, D., Bareille, R., Gindre, M., Sewing, A., Laugier, P. and Amedee, J.** (2008). Additive effect of RGD coating to functionalized titanium surfaces on human osteoprogenitor cell adhesion and spreading. *Tissue Eng Part A* **14**, 1445-55.

**Lean, J. M., Matsuo, K., Fox, S. W., Fuller, K., Gibson, F. M., Draycott, G., Wani, M. R., Bayley, K. E., Wong, B. R., Choi, Y. et al.** (2000). Osteoclast lineage commitment of bone marrow precursors through expression of membrane-bound TRANCE. *Bone* **27**, 29-40.

## H. REFERENCES

- Lees, R. L., Sabharwal, V. K. and Heersche, J. N.** (2001). Resorptive state and cell size influence intracellular pH regulation in rabbit osteoclasts cultured on collagen-hydroxyapatite films. *Bone* **28**, 187-94.
- Lehenkari, P., Hentunen, T. A., Laitala-Leinonen, T., Tuukkanen, J. and Vaananen, H. K.** (1998). Carbonic anhydrase II plays a major role in osteoclast differentiation and bone resorption by effecting the steady state intracellular pH and Ca<sup>2+</sup>. *Exp Cell Res* **242**, 128-37.
- Leiss, M., Beckmann, K., Giros, A., Costell, M. and Fassler, R.** (2008). The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 502-7.
- Lemmon, C. A., Chen, C. S. and Romer, L. H.** (2009). Cell traction forces direct fibronectin matrix assembly. *Biophys J* **96**, 729-38.
- Leonova, E. V., Pennington, K. E., Krebsbach, P. H. and Kohn, D. H.** (2006). Substrate mineralization stimulates focal adhesion contact redistribution and cell motility of bone marrow stromal cells. *J Biomed Mater Res A* **79**, 263-70.
- Lewis, A. K. and Bridgman, P. C.** (1992). Nerve growth cone lamellipodia contain two populations of actin filaments that differ in organization and polarity. *J Cell Biol* **119**, 1219-43.
- Li, C., Hu, Y., Mayr, M. and Xu, Q.** (1999). Cyclic strain stress-induced mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 1 expression in vascular smooth muscle cells is regulated by Ras/Rac-MAPK pathways. *J Biol Chem* **274**, 25273-80.
- Li, M., Amizuka, N., Oda, K., Tokunaga, K., Ito, T., Takeuchi, K., Takagi, R. and Maeda, T.** (2004). Histochemical evidence of the initial chondrogenesis and osteogenesis in the periosteum of a rib fractured model: implications of osteocyte involvement in periosteal chondrogenesis. *Microsc Res Tech* **64**, 330-42.
- Libouban, H.** (2008). Remodelage osseux, Traité des maladies métaboliques osseuses de l'adulte. *Médecine-Sciences Flammarion*, 3-9.
- Liedert, A., Kaspar, D., Blakytyn, R., Claes, L. and Ignatius, A.** (2006). Signal transduction pathways involved in mechanotransduction in bone cells. *Biochem Biophys Res Commun* **349**, 1-5.
- Lin, L., Chow, K. L. and Leng, Y.** (2009). Study of hydroxyapatite osteoinductivity with an osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A* **89**, 326-35.
- Lincks, J., Boyan, B. D., Blanchard, C. R., Lohmann, C. H., Liu, Y., Cochran, D. L., Dean, D. D. and Schwartz, Z.** (1998). Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials* **19**, 2219-32.
- Liu, D., Vandahl, B. B., Birkelund, S., Nielsen, L. B. and Melsen, B.** (2004). Secretion of osteopontin from MG-63 cells under a physiological level of mechanical strain in vitro—a [35S] incorporation approach. *Eur J Orthod* **26**, 143-9.
- Liu, S., Calderwood, D. A. and Ginsberg, M. H.** (2000). Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci* **113 (Pt 20)**, 3563-71.
- Liu, W. F. and Chen, C. S.** (2007). Cellular and multicellular form and function. *Adv Drug Deliv Rev* **59**, 1319-28.
- Liu, X., Zhang, X. and Luo, Z. P.** (2005). Strain-related collagen gene expression in human osteoblast-like cells. *Cell Tissue Res* **322**, 331-4.
- Liu, Y., Cooper, P. R., Barralet, J. E. and Shelton, R. M.** (2007a). Influence of calcium phosphate crystal assemblies on the proliferation and osteogenic gene expression of rat bone marrow stromal cells. *Biomaterials* **28**, 1393-403.



## H. REFERENCES

- Liu, Y., Li, L., Wu, J., Liao, Y., Liu, X. and Wu, W.** (2007b). [Effects of fluid shear stress on bone resorption in rat osteoclasts]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* **24**, 544-8.
- Lo, C. M., Wang, H. B., Dembo, M. and Wang, Y. L.** (2000). Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J* **79**, 144-52.
- Lohman, E. B., 3rd, Petrofsky, J. S., Maloney-Hinds, C., Betts-Schwab, H. and Thorpe, D.** (2007). The effect of whole body vibration on lower extremity skin blood flow in normal subjects. *Med Sci Monit* **13**, CR71-6.
- Luo, G., Ducky, P., McKee, M. D., Pinero, G. J., Loyer, E., Behringer, R. R. and Karsenty, G.** (1997). Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* **386**, 78-81.
- Luu, Y. K., Capilla, E., Rosen, C. J., Gilsanz, V., Pessin, J. E., Judex, S. and Rubin, C. T.** (2009). Mechanical stimulation of mesenchymal stem cell proliferation and differentiation promotes osteogenesis while preventing dietary-induced obesity. *J Bone Miner Res* **24**, 50-61.
- Lynch, M. A., Brodt, M. D. and Silva, M. J.** (2010). Skeletal effects of whole-body vibration in adult and aged mice. *J Orthop Res* **28**, 241-7.
- MacIntyre, I., Zaidi, M., Alam, A. S., Datta, H. K., Moonga, B. S., Lidbury, P. S., Hecker, M. and Vane, J. R.** (1991). Osteoclastic inhibition: an action of nitric oxide not mediated by cyclic GMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2936-40.
- Mackie, E. J. and Tucker, R. P.** (1992). Tenascin in bone morphogenesis: expression by osteoblasts and cell type-specific expression of splice variants. *J Cell Sci* **103 (Pt 3)**, 765-71.
- MacQuarrie, R. A., Fang Chen, Y., Coles, C. and Anderson, G. I.** (2004). Wear-particle-induced osteoclast osteolysis: the role of particulates and mechanical strain. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **69**, 104-12.
- Maimoun, L., Mariano-Goulart, D., Couret, I., Manetta, J., Peruchon, E., Micallef, J. P., Verdier, R., Rossi, M. and Leroux, J. L.** (2004). Effects of physical activities that induce moderate external loading on bone metabolism in male athletes. *J Sports Sci* **22**, 875-83.
- Malone, J. D., Teitelbaum, S. L., Griffin, G. L., Senior, R. M. and Kahn, A. J.** (1982). Recruitment of osteoclast precursors by purified bone matrix constituents. *J Cell Biol* **92**, 227-30.
- Maloney-Hinds, C., Petrofsky, J. S. and Zimmerman, G.** (2008). The effect of 30 Hz vs. 50 Hz passive vibration and duration of vibration on skin blood flow in the arm. *Med Sci Monit* **14**, CR112-6.
- Mancini, L., Moradi-Bidhendi, N., Becherini, L., Martinetti, V. and MacIntyre, I.** (2000). The biphasic effects of nitric oxide in primary rat osteoblasts are cGMP dependent. *Biochem Biophys Res Commun* **274**, 477-81.
- Manelli, F. and Giustina, A.** (2000). Glucocorticoid-induced osteoporosis. *Trends Endocrinol Metab* **11**, 79-85.
- Mano, J. F., Sousa, R. A., Boesel, L. F., Neves, N. M. and Reis, R. L.** (2004). Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: state of the art and recent developments. *Compos Sci Technol* **64**, 789-217.
- Manolagas, S. C.** (2000). Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* **21**, 115-37.
- Mao, Y. and Schwarzbauer, J. E.** (2005a). Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biol* **24**, 389-99.

## H. REFERENCES

- Mao, Y. and Schwarzbauer, J. E.** (2005b). Stimulatory effects of a three-dimensional microenvironment on cell-mediated fibronectin fibrillogenesis. *J Cell Sci* **118**, 4427-36.
- Marinucci, L., Balloni, S., Becchetti, E., Belcastro, S., Guerra, M., Calvitti, M., Lilli, C., Calvi, E. M. and Locci, P.** (2006). Effect of titanium surface roughness on human osteoblast proliferation and gene expression in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants* **21**, 719-25.
- Martin, R. B.** (2002). Size, structure and gender: lessons about fracture risk. *J Musculoskelet Neuronal Interact* **2**, 209-11.
- Martin, T. J. and Sims, N. A.** (2005). Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends Mol Med* **11**, 76-81.
- Matsumoto, A., Comatas, K. E., Liu, L. and Stamler, J. S.** (2003). Screening for nitric oxide-dependent protein-protein interactions. *Science* **301**, 657-61.
- Matsumura, K., Hayami, T., Hyon, S. H. and Tsutsumi, S.** (2009). Control of proliferation and differentiation of osteoblasts on apatite-coated poly(vinyl alcohol) hydrogel as an artificial articular cartilage material. *J Biomed Mater Res A*.
- Mattila, P. K. and Lappalainen, P.** (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 446-54.
- Mbalaviele, G., Shin, C. S. and Civitelli, R.** (2006). Cell-cell adhesion and signaling through cadherins: connecting bone cells in their microenvironment. *J Bone Miner Res* **21**, 1821-7.
- McAllister, T. N., Du, T. and Frangos, J. A.** (2000). Fluid shear stress stimulates prostaglandin and nitric oxide release in bone marrow-derived preosteoclast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* **270**, 643-8.
- McBeath, R., Pirone, D. M., Nelson, C. M., Bhadriraju, K. and Chen, C. S.** (2004). Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell* **6**, 483-95.
- McHugh, K. P., Hodivala-Dilke, K., Zheng, M. H., Namba, N., Lam, J., Novack, D., Feng, X., Ross, F. P., Hynes, R. O. and Teitelbaum, S. L.** (2000). Mice lacking beta3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. *J Clin Invest* **105**, 433-40.
- McKee, M. D. and Nanci, A.** (1996). Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth, and osseointegrated implants: ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover, and repair. *Microsc Res Tech* **33**, 141-64.
- Meazzini, M. C., Toma, C. D., Schaffer, J. L., Gray, M. L. and Gerstenfeld, L. C.** (1998). Osteoblast cytoskeletal modulation in response to mechanical strain in vitro. *J Orthop Res* **16**, 170-80.
- Medeiros, N. A., Burnette, D. T. and Forscher, P.** (2006). Myosin II functions in actin-bundle turnover in neuronal growth cones. *Nat Cell Biol* **8**, 215-26.
- Mehlich, D. R., Leider, A. S. and Roberts, W. E.** (1990). Histologic evaluation of the bone/graft interface after mandibular augmentation with hydroxylapatite/purified fibrillar collagen composite implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **70**, 685-92.
- Meunier, P. J. and Boivin, G.** (1997). Bone mineral density reflects bone mass but also the degree of mineralization of bone: therapeutic implications. *Bone* **21**, 373-7.
- Midura, R. J., Dillman, C. J. and Grabiner, M. D.** (2005). Low amplitude, high frequency strains imposed by electrically stimulated skeletal muscle retards the development of osteopenia in the tibiae of hindlimb suspended rats. *Med Eng Phys* **27**, 285-93.
- Midy, V. and Plouet, J.** (1994). Vasculotropin/vascular endothelial growth factor induces differentiation in cultured osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **199**, 380-6.

## H. REFERENCES

- Miller, S. C., de Saint-Georges, L., Bowman, B. M. and Jee, W. S.** (1989). Bone lining cells: structure and function. *Scanning Microsc* **3**, 953-60; discussion 960-1.
- Miller, S. C. and Jee, W. S.** (1987). The bone lining cell: a distinct phenotype? *Calcif Tissue Int* **41**, 1-5.
- Millward-Sadler, S. J. and Salter, D. M.** (2004). Integrin-dependent signal cascades in chondrocyte mechanotransduction. *Ann Biomed Eng* **32**, 435-46.
- Mitchison, T. and Kirschner, M.** (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**, 237-42.
- Mitchison, T. and Kirschner, M.** (1988). Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* **1**, 761-72.
- Mitchison, T. J.** (1993). Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules. *Science* **261**, 1044-7.
- Mitsui, N., Suzuki, N., Maeno, M., Mayahara, K., Yanagisawa, M., Otsuka, K. and Shimizu, N.** (2005). Optimal compressive force induces bone formation via increasing bone sialoprotein and prostaglandin E(2) production appropriately. *Life Sci* **77**, 3168-82.
- Miyauchi, A., Gotoh, M., Kamioka, H., Notoya, K., Sekiya, H., Takagi, Y., Yoshimoto, Y., Ishikawa, H., Chihara, K., Takano-Yamamoto, T. et al.** (2006). AlphaVbeta3 integrin ligands enhance volume-sensitive calcium influx in mechanically stretched osteocytes. *J Bone Miner Metab* **24**, 498-504.
- Mizushima-Sugano, J., Maeda, T. and Miki-Noumura, T.** (1983). Flexural rigidity of singlet microtubules estimated from statistical analysis of their contour lengths and end-to-end distances. *Biochim Biophys Acta* **755**, 257-62.
- Mogilner, A. and Keren, K.** (2009). The shape of motile cells. *Curr Biol* **19**, R762-71.
- Monson, J. P., Drake, W. M., Carroll, P. V., Weaver, J. U., Rodriguez-Arno, J. and Savage, M. O.** (2002). Influence of growth hormone on accretion of bone mass. *Horm Res* **58 Suppl 1**, 52-6.
- Morinobu, M., Ishijima, M., Rittling, S. R., Tsuji, K., Yamamoto, H., Nifuji, A., Denhardt, D. T. and Noda, M.** (2003). Osteopontin expression in osteoblasts and osteocytes during bone formation under mechanical stress in the calvarial suture in vivo. *J Bone Miner Res* **18**, 1706-15.
- Mosley, J. R. and Lanyon, L. E.** (1998). Strain rate as a controlling influence on adaptive modeling in response to dynamic loading of the ulna in growing male rats. *Bone* **23**, 313-8.
- Moursi, A. M., Winnard, A. V., Winnard, P. L., Lannutti, J. J. and Seghi, R. R.** (2002). Enhanced osteoblast response to a polymethylmethacrylate-hydroxyapatite composite. *Biomaterials* **23**, 133-44.
- Moussavi, R. S., Kelley, C. A. and Adelstein, R. S.** (1993). Phosphorylation of vertebrate nonmuscle and smooth muscle myosin heavy chains and light chains. *Mol Cell Biochem* **127-128**, 219-27.
- Mulari, M. T., Qu, Q., Harkonen, P. L. and Vaananen, H. K.** (2004). Osteoblast-like cells complete osteoclastic bone resorption and form new mineralized bone matrix in vitro. *Calcif Tissue Int* **75**, 253-61.
- Muller, P., Bulnheim, U., Diener, A., Luthen, F., Teller, M., Klinkenberg, E. D., Neumann, H. G., Nebe, B., Liebold, A., Steinhoff, G. et al.** (2008). Calcium phosphate surfaces promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med* **12**, 281-91.
- Murphy-Ullrich, J. E.** (2001). The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? *J Clin Invest* **107**, 785-90.

## H. REFERENCES

- Murshid, S. A., Kamioka, H., Ishihara, Y., Ando, R., Sugawara, Y. and Takano-Yamamoto, T.** (2007). Actin and microtubule cytoskeletons of the processes of 3D-cultured MC3T3-E1 cells and osteocytes. *J Bone Miner Metab* **25**, 151-8.
- Nakagawa, M., Kaneda, T., Arakawa, T., Morita, S., Sato, T., Yomada, T., Hanada, K., Kumegawa, M. and Hakeda, Y.** (2000). Vascular endothelial growth factor (VEGF) directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts. *FEBS Lett* **473**, 161-4.
- Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R. and de Crombrughe, B.** (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* **108**, 17-29.
- Nampei, A., Hashimoto, J., Hayashida, K., Tsuboi, H., Shi, K., Tsuji, I., Miyashita, H., Yamada, T., Matsukawa, N., Matsumoto, M. et al.** (2004). Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) is highly expressed in osteocytes in human bone. *J Bone Miner Metab* **22**, 176-84.
- Nandi, S. K., Kundu, B., Ghosh, S. K., De, D. K. and Basu, D.** (2008). Efficacy of nano-hydroxyapatite prepared by an aqueous solution combustion technique in healing bone defects of goat. *J Vet Sci* **9**, 183-91.
- Nauman, E. A., Satcher, R. L., Keaveny, T. M., Halloran, B. P. and Bikle, D. D.** (2001). Osteoblasts respond to pulsatile fluid flow with short-term increases in PGE(2) but no change in mineralization. *J Appl Physiol* **90**, 1849-54.
- Nazhat, S. N., Joseph, R., Wang, M., Smith, R., Tanner, K. E. and Bonfield, W.** (2000). Dynamic mechanical characterization of hydroxyapatite reinforced polyethylene: effect of particle size. *J Mater Sci Mater Med* **11**, 621-8.
- Nelson, C. M., Jean, R. P., Tan, J. L., Liu, W. F., Sniadecki, N. J., Spector, A. A. and Chen, C. S.** (2005). Emergent patterns of growth controlled by multicellular form and mechanics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11594-9.
- Newman, P. and Watt, F. M.** (1988). Influence of cytochalasin D-induced changes in cell shape on proteoglycan synthesis by cultured articular chondrocytes. *Exp Cell Res* **178**, 199-210.
- Ngiam, M., Liao, S., Patil, A. J., Cheng, Z., Chan, C. K. and Ramakrishna, S.** (2009). The fabrication of nano-hydroxyapatite on PLGA and PLGA/collagen nanofibrous composite scaffolds and their effects in osteoblastic behavior for bone tissue engineering. *Bone*.
- Nichols, S. A., Dirks, W., Pearse, J. S. and King, N.** (2006). Early evolution of animal cell signaling and adhesion genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12451-6.
- Niida, S., Kaku, M., Amano, H., Yoshida, H., Kataoka, H., Nishikawa, S., Tanne, K., Maeda, N., Nishikawa, S. and Kodama, H.** (1999). Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. *J Exp Med* **190**, 293-8.
- Noble, B. S., Peet, N., Stevens, H. Y., Brabbs, A., Mosley, J. R., Reilly, G. C., Reeve, J., Skerry, T. M. and Lanyon, L. E.** (2003). Mechanical loading: biphasic osteocyte survival and targeting of osteoclasts for bone destruction in rat cortical bone. *Am J Physiol Cell Physiol* **284**, C934-43.
- Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R. A. and Downing, K. H.** (1999). High-resolution model of the microtubule. *Cell* **96**, 79-88.
- Nordstrom, A., Olsson, T. and Nordstrom, P.** (2005). Bone gained from physical activity and lost through detraining: a longitudinal study in young males. *Osteoporos Int* **16**, 835-41.
- Norman, M. U. and Hickey, M. J.** (2005). Mechanisms of lymphocyte migration in autoimmune disease. *Tissue Antigens* **66**, 163-72.

## H. REFERENCES

- Norrdin, R. W., Jee, W. S. and High, W. B.** (1990). The role of prostaglandins in bone in vivo. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **41**, 139-49.
- Novak, P. and Novak, V.** (2006). Effect of step-synchronized vibration stimulation of soles on gait in Parkinson's disease: a pilot study. *J Neuroeng Rehabil* **3**, 9.
- Okamoto, K., Matsuura, T., Hosokawa, R. and Akagawa, Y.** (1998). RGD peptides regulate the specific adhesion scheme of osteoblasts to hydroxyapatite but not to titanium. *J Dent Res* **77**, 481-7.
- Okamoto, M., Dohi, Y., Ohgushi, H., Shimaoka, H., Ikeuchi, M., Matsushima, A., Yonemasu, K. and Hosoi, H.** (2006). Influence of the porosity of hydroxyapatite ceramics on in vitro and in vivo bone formation by cultured rat bone marrow stromal cells. *J Mater Sci Mater Med* **17**, 327-36.
- Oonishi, H.** (1991). Orthopaedic applications of hydroxyapatite. *Biomaterials* **12**, 171-8.
- Oreffo, R. O., Driessens, F. C., Planell, J. A. and Triffitt, J. T.** (1998). Growth and differentiation of human bone marrow osteoprogenitors on novel calcium phosphate cements. *Biomaterials* **19**, 1845-54.
- Otto, F., Thornell, A. P., Crompton, T., Denzel, A., Gilmour, K. C., Rosewell, I. R., Stamp, G. W., Beddington, R. S., Mundlos, S., Olsen, B. R. et al.** (1997). *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* **89**, 765-71.
- Owen, M. and Friedenstein, A. J.** (1988). Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* **136**, 42-60.
- Oxlund, B. S., Ortoft, G., Andreassen, T. T. and Oxlund, H.** (2003). Low-intensity, high-frequency vibration appears to prevent the decrease in strength of the femur and tibia associated with ovariectomy of adult rats. *Bone* **32**, 69-77.
- Paic, F., Igwe, J. C., Nori, R., Kronenberg, M. S., Franceschetti, T., Harrington, P., Kuo, L., Shin, D. G., Rowe, D. W., Harris, S. E. et al.** (2009). Identification of differentially expressed genes between osteoblasts and osteocytes. *Bone* **45**, 682-92.
- Palumbo, C.** (1986). A three-dimensional ultrastructural study of osteoid-osteocytes in the tibia of chick embryos. *Cell Tissue Res* **246**, 125-31.
- Palumbo, C., Palazzini, S., Zaffe, D. and Marotti, G.** (1990). Osteocyte differentiation in the tibia of newborn rabbit: an ultrastructural study of the formation of cytoplasmic processes. *Acta Anat (Basel)* **137**, 350-8.
- Pampaloni, F., Reynaud, E. G. and Stelzer, E. H.** (2007). The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 839-45.
- Pankov, R., Cukierman, E., Katz, B. Z., Matsumoto, K., Lin, D. C., Lin, S., Hahn, C. and Yamada, K. M.** (2000). Integrin dynamics and matrix assembly: tensin-dependent translocation of  $\alpha(5)\beta(1)$  integrins promotes early fibronectin fibrillogenesis. *J Cell Biol* **148**, 1075-90.
- Pantaloni, D., Le Clairche, C. and Carlier, M. F.** (2001). Mechanism of actin-based motility. *Science* **292**, 1502-6.
- Pardo, S. J., Patel, M. J., Sykes, M. C., Platt, M. O., Boyd, N. L., Sorescu, G. P., Xu, M., van Loon, J. J., Wang, M. D. and Jo, H.** (2005). Simulated microgravity using the Random Positioning Machine inhibits differentiation and alters gene expression profiles of 2T3 preosteoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**, C1211-21.
- Parfitt, A. M.** (1982). The coupling of bone formation to bone resorption: a critical analysis of the concept and of its relevance to the pathogenesis of osteoporosis. *Metab Bone Dis Relat Res* **4**, 1-6.

## H. REFERENCES

- Parfitt, A. M.** (1994). Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem* **55**, 273-86.
- Parfitt, A. M.** (2001). The bone remodeling compartment: a circulatory function for bone lining cells. *J Bone Miner Res* **16**, 1583-5.
- Patel, M. J., Chang, K. H., Sykes, M. C., Talish, R., Rubin, C. and Jo, H.** (2009). Low magnitude and high frequency mechanical loading prevents decreased bone formation responses of 2T3 preosteoblasts. *J Cell Biochem* **106**, 306-16.
- Pelham, R. J., Jr. and Wang, Y.** (1997). Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13661-5.
- Perrier, A., Dumas, V., Linossier, M. T., Fournier, C., Jurdic, P., Rattner, A., Vico, L. and Guignandon, A.** (2010). Apatite content of collagen materials dose-dependently increases pre-osteoblastic cell deposition of a cement line-like matrix. *Bone*.
- Petrie, R. J., Doyle, A. D. and Yamada, K. M.** (2009). Random versus directionally persistent cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 538-49.
- Pitsillides, A. A., Rawlinson, S. C., Suswillo, R. F., Bourrin, S., Zaman, G. and Lanyon, L. E.** (1995). Mechanical strain-induced NO production by bone cells: a possible role in adaptive bone (re)modeling? *Faseb J* **9**, 1614-22.
- Pollard, T. D. and Borisy, G. G.** (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**, 453-65.
- Pollard, T. D. and Cooper, J. A.** (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* **326**, 1208-12.
- Pollard, T. D. and Wehling, R. R.** (1974). Actin and myosin and cell movement. *CRC Crit Rev Biochem* **2**, 1-65.
- Ponik, S. M. and Pavalko, F. M.** (2004). Formation of focal adhesions on fibronectin promotes fluid shear stress induction of COX-2 and PGE2 release in MC3T3-E1 osteoblasts. *J Appl Physiol* **97**, 135-42.
- Ponik, S. M., Triplett, J. W. and Pavalko, F. M.** (2007). Osteoblasts and osteocytes respond differently to oscillatory and unidirectional fluid flow profiles. *J Cell Biochem* **100**, 794-807.
- Ponti, A., Machacek, M., Gupton, S. L., Waterman-Storer, C. M. and Danuser, G.** (2004). Two distinct actin networks drive the protrusion of migrating cells. *Science* **305**, 1782-6.
- Poole, K. E., van Bezooijen, R. L., Loveridge, N., Hamersma, H., Papapoulos, S. E., Lowik, C. W. and Reeve, J.** (2005). Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *Faseb J* **19**, 1842-4.
- Posner, A. S.** (1985). The mineral of bone. *Clin Orthop Relat Res*, 87-99.
- Pourati, J., Maniotis, A., Spiegel, D., Schaffer, J. L., Butler, J. P., Fredberg, J. J., Ingber, D. E., Stamenovic, D. and Wang, N.** (1998). Is cytoskeletal tension a major determinant of cell deformability in adherent endothelial cells? *Am J Physiol* **274**, C1283-9.
- Prisby, R. D., Lafage-Proust, M. H., Malaval, L., Belli, A. and Vico, L.** (2008). Effects of whole body vibration on the skeleton and other organ systems in man and animal models: what we know and what we need to know. *Ageing Res Rev* **7**, 319-29.
- Putnam, A. J., Cunningham, J. J., Pillemer, B. B. and Mooney, D. J.** (2003). External mechanical strain regulates membrane targeting of Rho GTPases by controlling microtubule assembly. *Am J Physiol Cell Physiol* **284**, C627-39.

## H. REFERENCES

- Qi, M. C., Hu, J., Zou, S. J., Han, L. C. and Luo, E.** (2005). [The changes of cytoskeleton F-actin in rat bone marrow mesenchymal stem cells and calvarial osteoblasts under mechanical strain]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* **23**, 110-2, 121.
- Qin, Y. X., Rubin, C. T. and McLeod, K. J.** (1998). Nonlinear dependence of loading intensity and cycle number in the maintenance of bone mass and morphology. *J Orthop Res* **16**, 482-9.
- Quinn, J. M., Morfis, M., Lam, M. H., Elliott, J., Kartsogiannis, V., Williams, E. D., Gillespie, M. T., Martin, T. J. and Sexton, P. M.** (1999). Calcitonin receptor antibodies in the identification of osteoclasts. *Bone* **25**, 1-8.
- Quinn, J. M., Sabokbar, A., Denne, M., de Vernejoul, M. C., McGee, J. O. and Athanasou, N. A.** (1997). Inhibitory and stimulatory effects of prostaglandins on osteoclast differentiation. *Calcif Tissue Int* **60**, 63-70.
- Raisz, L. G.** (1999). Prostaglandins and bone: physiology and pathophysiology. *Osteoarthritis Cartilage* **7**, 419-21.
- Raisz, L. G.** (2005). Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest* **115**, 3318-25.
- Ramires, P. A., Romito, A., Cosentino, F. and Milella, E.** (2001). The influence of titania/hydroxyapatite composite coatings on in vitro osteoblasts behaviour. *Biomaterials* **22**, 1467-74.
- Raynaud, S., Champion, E., Lafon, J. P. and Bernache-Assollant, D.** (2002). Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio III. Mechanical properties and degradation in solution of hot pressed ceramics. *Biomaterials* **23**, 1081-9.
- Rea, S. M., Best, S. M. and Bonfield, W.** (2004). Bioactivity of ceramic-polymer composites with varied composition and surface topography. *J Mater Sci Mater Med* **15**, 997-1005.
- Rhee, S. and Grinnell, F.** (2007). Fibroblast mechanics in 3D collagen matrices. *Adv Drug Deliv Rev* **59**, 1299-305.
- Rhee, S., Jiang, H., Ho, C. H. and Grinnell, F.** (2007). Microtubule function in fibroblast spreading is modulated according to the tension state of cell-matrix interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 5425-30.
- Richard, D., Dumelie, N., Benhayoune, H., Bouthors, S., Guillaume, C., Lalun, N., Balossier, G. and Laurent-Maquin, D.** (2006). Behavior of human osteoblast-like cells in contact with electrodeposited calcium phosphate coatings. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **79**, 108-15.
- Ridley, A. J.** (2006). Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol* **16**, 522-9.
- Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Parsons, J. T. and Horwitz, A. R.** (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* **302**, 1704-9.
- Riveline, D., Zamir, E., Balaban, N. Q., Schwarz, U. S., Ishizaki, T., Narumiya, S., Kam, Z., Geiger, B. and Bershadsky, A. D.** (2001). Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol* **153**, 1175-86.
- Rizzi, S. C., Heath, D. J., Coombes, A. G., Bock, N., Textor, M. and Downes, S.** (2001). Biodegradable polymer/hydroxyapatite composites: surface analysis and initial attachment of human osteoblasts. *J Biomed Mater Res* **55**, 475-86.
- Rizzo, V., Sung, A., Oh, P. and Schnitzer, J. E.** (1998). Rapid mechanotransduction in situ at the luminal cell surface of vascular endothelium and its caveolae. *J Biol Chem* **273**, 26323-9.

## H. REFERENCES

- Robison, R.** (1923). The Possible Significance of Hexosephosphoric Esters in Ossification. *Biochem J* **17**, 286-93.
- Robledo, R. F., Rajan, L., Li, X. and Lufkin, T.** (2002). The Dlx5 and Dlx6 homeobox genes are essential for craniofacial, axial, and appendicular skeletal development. *Genes Dev* **16**, 1089-101.
- Robling, A. G., Castillo, A. B. and Turner, C. H.** (2006). Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng* **8**, 455-98.
- Robling, A. G., Hinant, F. M., Burr, D. B. and Turner, C. H.** (2002). Improved bone structure and strength after long-term mechanical loading is greatest if loading is separated into short bouts. *J Bone Miner Res* **17**, 1545-54.
- Robling, A. G., Niziolek, P. J., Baldrige, L. A., Condon, K. W., Allen, M. R., Alam, I., Mantila, S. M., Gluhak-Heinrich, J., Bellido, T. M., Harris, S. E. et al.** (2008). Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J Biol Chem* **283**, 5866-75.
- Roca-Cusachs, P., Gauthier, N. C., Del Rio, A. and Sheetz, M. P.** (2009). Clustering of alpha(5)beta(1) integrins determines adhesion strength whereas alpha(v)beta(3) and talin enable mechanotransduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 16245-50.
- Rockwell, J. C., Sorensen, A. M., Baker, S., Leahey, D., Stock, J. L., Michaels, J. and Baran, D. T.** (1990). Weight training decreases vertebral bone density in premenopausal women: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* **71**, 988-93.
- Rodionov, V. I. and Borisy, G. G.** (1997). Microtubule treadmilling in vivo. *Science* **275**, 215-8.
- Rodriguez, O. C., Schaefer, A. W., Mandato, C. A., Forscher, P., Bement, W. M. and Waterman-Storer, C. M.** (2003). Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat Cell Biol* **5**, 599-609.
- Roelants, M., Verschueren, S. M., Delecluse, C., Levin, O. and Stijnen, V.** (2006). Whole-body-vibration-induced increase in leg muscle activity during different squat exercises. *J Strength Cond Res* **20**, 124-9.
- Roelofsen, J., Klein-Nulend, J. and Burger, E. H.** (1995). Mechanical stimulation by intermittent hydrostatic compression promotes bone-specific gene expression in vitro. *J Biomech* **28**, 1493-503.
- Roesler, H.** (1981). Some historical remarks on the theory of cancellous bone structure (Wolff's law). In: Cowin SC (ed) *Mechanical Properties of Bone*, ASME, New York, 27-42.
- Romano, P. R., Caton, J. G. and Puzas, J. E.** (1997). The reversal line may be a key modulator of osteoblast function: observations from an alveolar bone wound-healing model. *J Periodontol Res* **32**, 143-7.
- Rosa, A. L., Beloti, M. M. and van Noort, R.** (2003). Osteoblastic differentiation of cultured rat bone marrow cells on hydroxyapatite with different surface topography. *Dent Mater* **19**, 768-72.
- Rosenberg, N.** (2003). The role of the cytoskeleton in mechanotransduction in human osteoblast-like cells. *Hum Exp Toxicol* **22**, 271-4.
- Roualdes, O., Duclos, M. E., Gutknecht, D., Frappart, L., Chevalier, J. and Hartmann, D. J.** (2010). In vitro and in vivo evaluation of an alumina-zirconia composite for arthroplasty applications. *Biomaterials* **31**, 2043-54.
- Roux, W.** (1895). *Gesammelte Abhandlungen. Vol 1. Leipzig: Engelmann.*
- Roy, T. D., Simon, J. L., Ricci, J. L., Rekow, E. D., Thompson, V. P. and Parsons, J. R.** (2003). Performance of degradable composite bone repair products made via three-dimensional fabrication techniques. *J Biomed Mater Res A* **66**, 283-91.



## H. REFERENCES

- Rubin, C., Recker, R., Cullen, D., Ryaby, J., McCabe, J. and McLeod, K.** (2004). Prevention of postmenopausal bone loss by a low-magnitude, high-frequency mechanical stimuli: a clinical trial assessing compliance, efficacy, and safety. *J Bone Miner Res* **19**, 343-51.
- Rubin, C., Turner, A. S., Bain, S., Mallinckrodt, C. and McLeod, K.** (2001a). Anabolism. Low mechanical signals strengthen long bones. *Nature* **412**, 603-4.
- Rubin, C., Turner, A. S., Mallinckrodt, C., Jerome, C., McLeod, K. and Bain, S.** (2002a). Mechanical strain, induced noninvasively in the high-frequency domain, is anabolic to cancellous bone, but not cortical bone. *Bone* **30**, 445-52.
- Rubin, C., Turner, A. S., Muller, R., Mittra, E., McLeod, K., Lin, W. and Qin, Y. X.** (2002b). Quantity and quality of trabecular bone in the femur are enhanced by a strongly anabolic, noninvasive mechanical intervention. *J Bone Miner Res* **17**, 349-57.
- Rubin, C., Xu, G. and Judex, S.** (2001b). The anabolic activity of bone tissue, suppressed by disuse, is normalized by brief exposure to extremely low-magnitude mechanical stimuli. *Faseb J* **15**, 2225-9.
- Rubin, C. T., Capilla, E., Luu, Y. K., Busa, B., Crawford, H., Nolan, D. J., Mittal, V., Rosen, C. J., Pessin, J. E. and Judex, S.** (2007). Adipogenesis is inhibited by brief, daily exposure to high-frequency, extremely low-magnitude mechanical signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 17879-84.
- Rubin, C. T. and Lanyon, L. E.** (1985). Regulation of bone mass by mechanical strain magnitude. *Calcif Tissue Int* **37**, 411-7.
- Rubin, C. T. and McLeod, K. J.** (1994). Promotion of bony ingrowth by frequency-specific, low-amplitude mechanical strain. *Clin Orthop Relat Res*, 165-74.
- Rubin, C. T., McLeod, K. J. and Bain, S. D.** (1990). Functional strains and cortical bone adaptation: epigenetic assurance of skeletal integrity. *J Biomech* **23 Suppl 1**, 43-54.
- Rubin, C. T., Sommerfeldt, D. W., Judex, S. and Qin, Y.** (2001c). Inhibition of osteopenia by low magnitude, high-frequency mechanical stimuli. *Drug Discov Today* **6**, 848-858.
- Rubin, J., Biskobing, D., Fan, X., Rubin, C., McLeod, K. and Taylor, W. R.** (1997). Pressure regulates osteoclast formation and MCSF expression in marrow culture. *J Cell Physiol* **170**, 81-7.
- Rubin, J., Fan, X., Biskobing, D. M., Taylor, W. R. and Rubin, C. T.** (1999). Osteoclastogenesis is repressed by mechanical strain in an in vitro model. *J Orthop Res* **17**, 639-45.
- Rubin, J., McLeod, K. J., Titus, L., Nanes, M. S., Catherwood, B. D. and Rubin, C. T.** (1996). Formation of osteoclast-like cells is suppressed by low frequency, low intensity electric fields. *J Orthop Res* **14**, 7-15.
- Rubin, J., Murphy, T., Nanes, M. S. and Fan, X.** (2000). Mechanical strain inhibits expression of osteoclast differentiation factor by murine stromal cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**, C1126-32.
- Rubin, J., Rubin, C. and Jacobs, C. R.** (2006). Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone. *Gene* **367**, 1-16.
- Ryder, K. D. and Duncan, R. L.** (2001). Parathyroid hormone enhances fluid shear-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> signaling in osteoblastic cells through activation of mechanosensitive and voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels. *J Bone Miner Res* **16**, 240-8.
- Ryu, J., Liu, L., Wong, T. P., Wu, D. C., Burette, A., Weinberg, R., Wang, Y. T. and Sheng, M.** (2006). A critical role for myosin IIb in dendritic spine morphology and synaptic function. *Neuron* **49**, 175-82.
- Saltel, F., Destaing, O., Bard, F., Eichert, D. and Jurdic, P.** (2004). Apatite-mediated actin dynamics in resorbing osteoclasts. *Mol Biol Cell* **15**, 5231-41.

## H. REFERENCES

- Salter, D. M., Robb, J. E. and Wright, M. O.** (1997). Electrophysiological responses of human bone cells to mechanical stimulation: evidence for specific integrin function in mechanotransduction. *J Bone Miner Res* **12**, 1133-41.
- Sato, K., Adachi, T., Matsuo, M. and Tomita, Y.** (2005). Quantitative evaluation of threshold fiber strain that induces reorganization of cytoskeletal actin fiber structure in osteoblastic cells. *J Biomech* **38**, 1895-901.
- Saunders, R., Szymczyk, K. H., Shapiro, I. M. and Adams, C. S.** (2007). Matrix regulation of skeletal cell apoptosis III: mechanism of ion pair-induced apoptosis. *J Cell Biochem* **100**, 703-15.
- Schachter, M.** (1997). Vascular smooth muscle cell migration, atherosclerosis, and calcium channel blockers. *Int J Cardiol* **62 Suppl 2**, S85-90.
- Schipani, E., Maes, C., Carmeliet, G. and Semenza, G. L.** (2009). Regulation of osteogenesis-angiogenesis coupling by HIFs and VEGF. *J Bone Miner Res* **24**, 1347-53.
- Schmid-Schonbein, G. W., Kosawada, T., Skalak, R. and Chien, S.** (1995). Membrane model of endothelial cells and leukocytes. A proposal for the origin of a cortical stress. *J Biomech Eng* **117**, 171-8.
- Schmidt, H. H., Gagne, G. D., Nakane, M., Pollock, J. S., Miller, M. F. and Murad, F.** (1992). Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. *J Histochem Cytochem* **40**, 1439-56.
- Scholey, J. M., Brust-Mascher, I. and Mogilner, A.** (2003). Cell division. *Nature* **422**, 746-52.
- Schuhfried, O., Mittermaier, C., Jovanovic, T., Pieber, K. and Paternostro-Sluga, T.** (2005). Effects of whole-body vibration in patients with multiple sclerosis: a pilot study. *Clin Rehabil* **19**, 834-42.
- Shemesh, T., Geiger, B., Bershadsky, A. D. and Kozlov, M. M.** (2005). Focal adhesions as mechanosensors: a physical mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12383-8.
- Sheu, T. J., Schwarz, E. M., Martinez, D. A., O'Keefe, R. J., Rosier, R. N., Zuscik, M. J. and Puzas, J. E.** (2003). A phage display technique identifies a novel regulator of cell differentiation. *J Biol Chem* **278**, 438-43.
- Sheu, T. J., Schwarz, E. M., O'Keefe, R. J., Rosier, R. N. and Puzas, J. E.** (2002). Use of a phage display technique to identify potential osteoblast binding sites within osteoclast lacunae. *J Bone Miner Res* **17**, 915-22.
- Shibutani, T., Iwanaga, H., Imai, K., Kitago, M., Doi, Y. and Iwayama, Y.** (2000). Use of glass slides coated with apatite-collagen complexes for measurement of osteoclastic resorption activity. *J Biomed Mater Res* **50**, 153-9.
- Shih, Y. L. and Rothfield, L.** (2006). The bacterial cytoskeleton. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 729-54.
- Shishatskaya, E. I., Khlusov, I. A. and Volova, T. G.** (2006). A hybrid PHB-hydroxyapatite composite for biomedical application: production, in vitro and in vivo investigation. *J Biomater Sci Polym Ed* **17**, 481-98.
- Shu, R., McMullen, R., Baumann, M. J. and McCabe, L. R.** (2003). Hydroxyapatite accelerates differentiation and suppresses growth of MC3T3-E1 osteoblasts. *J Biomed Mater Res A* **67**, 1196-204.
- Shyy, J. Y. and Chien, S.** (2002). Role of integrins in endothelial mechanosensing of shear stress. *Circ Res* **91**, 769-75.

## H. REFERENCES

- Sibilla, P., Sereni, A., Aguiari, G., Banzi, M., Manzati, E., Mischiati, C., Trombelli, L. and del Senno, L.** (2006). Effects of a hydroxyapatite-based biomaterial on gene expression in osteoblast-like cells. *J Dent Res* **85**, 354-8.
- Siller-Jackson, A. J., Burra, S., Gu, S., Xia, X., Bonewald, L. F., Sprague, E. and Jiang, J. X.** (2008). Adaptation of connexin 43-hemichannel prostaglandin release to mechanical loading. *J Biol Chem* **283**, 26374-82.
- Sims, N. A. and Gooi, J. H.** (2008). Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol* **19**, 444-51.
- Singhvi, R., Kumar, A., Lopez, G. P., Stephanopoulos, G. N., Wang, D. I., Whitesides, G. M. and Ingber, D. E.** (1994). Engineering cell shape and function. *Science* **264**, 696-8.
- Skedros, J. G., Holmes, J. L., Vajda, E. G. and Bloebaum, R. D.** (2005). Cement lines of secondary osteons in human bone are not mineral-deficient: new data in a historical perspective. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **286**, 781-803.
- Skerry, T. M.** (2006). One mechanostat or many? Modifications of the site-specific response of bone to mechanical loading by nature and nurture. *J Musculoskelet Neuronal Interact* **6**, 122-7.
- Skerry, T. M.** (2008). The response of bone to mechanical loading and disuse: fundamental principles and influences on osteoblast/osteocyte homeostasis. *Arch Biochem Biophys* **473**, 117-23.
- Skerry, T. M., Bitensky, L., Chayen, J. and Lanyon, L. E.** (1989). Early strain-related changes in enzyme activity in osteocytes following bone loading in vivo. *J Bone Miner Res* **4**, 783-8.
- Slautterback, D. B.** (1963). Cytoplasmic Microtubules. I. Hydra. *J Cell Biol* **18**, 367-88.
- Small, J. V., Geiger, B., Kaverina, I. and Bershadsky, A.** (2002). How do microtubules guide migrating cells? *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 957-64.
- Small, J. V. and Kaverina, I.** (2003). Microtubules meet substrate adhesions to arrange cell polarity. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 40-7.
- Soballe, K., Hansen, E. S., Brockstedt-Rasmussen, H., Hjortdal, V. E., Juhl, G. I., Pedersen, C. M., Hvid, I. and Bunger, C.** (1991). Gap healing enhanced by hydroxyapatite coating in dogs. *Clin Orthop Relat Res*, 300-7.
- Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V.** (2003). Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* **83**, 1325-58.
- Song, J. H., Kim, J. H., Park, S., Kang, W., Kim, H. W., Kim, H. E. and Jang, J. H.** (2008). Signaling responses of osteoblast cells to hydroxyapatite: the activation of ERK and SOX9. *J Bone Miner Metab* **26**, 138-42.
- Sousa, R. A., Oliveira, A. L., Reis, R. L., Cunha, A. M. and Bevis, M. J.** (2003). Bi-composite sandwich moldings: processing, mechanical performance and bioactive behavior. *J Mater Sci Mater Med* **14**, 385-97.
- Spector, E. R., Smith, S. M. and Sibonga, J. D.** (2009). Skeletal effects of long-duration head-down bed rest. *Aviat Space Environ Med* **80**, A23-8.
- Srinivasan, S., Weimer, D. A., Agans, S. C., Bain, S. D. and Gross, T. S.** (2002). Low-magnitude mechanical loading becomes osteogenic when rest is inserted between each load cycle. *J Bone Miner Res* **17**, 1613-20.
- Stamenovic, D., Mijailovich, S. M., Tolic-Norrelykke, I. M., Chen, J. and Wang, N.** (2002). Cell prestress. II. Contribution of microtubules. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**, C617-24.

## H. REFERENCES

- Steffen, A., Faix, J., Resch, G. P., Linkner, J., Wehland, J., Small, J. V., Rottner, K. and Stradal, T. E.** (2006). Filopodia formation in the absence of functional WAVE- and Arp2/3-complexes. *Mol Biol Cell* **17**, 2581-91.
- Stewart, A. D. and Hannan, J.** (2000). Total and regional bone density in male runners, cyclists, and controls. *Med Sci Sports Exerc* **32**, 1373-7.
- Stewart, J. M., Karman, C., Montgomery, L. D. and McLeod, K. J.** (2005). Plantar vibration improves leg fluid flow in perimenopausal women. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **288**, R623-9.
- Straub, F. B.** (1943). Actin. *Stud Inst Med Chem Univ Szeged (1942)* **2**, 3-15.
- Street, J. and Lenehan, B.** (2009). Vascular endothelial growth factor regulates osteoblast survival - evidence for an autocrine feedback mechanism. *J Orthop Surg Res* **4**, 19.
- Street, J. T., Lonehan B.J., Wang J.H., Wu Q.D. Redmond H.P.** (2006). Vascular endothelial growth factor regulates osteoblast survival-Evidence for an autocrine feedback mechanism. *The journal of bone and joint surgery* **88-B**, 33.
- Stylios, G., Wan, T. and Giannoudis, P.** (2007). Present status and future potential of enhancing bone healing using nanotechnology. *Injury* **38 Suppl 1**, S63-74.
- Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M. T. and Martin, T. J.** (1999). Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* **20**, 345-57.
- Sugawara, Y., Ando, R., Kamioka, H., Ishihara, Y., Murshid, S. A., Hashimoto, K., Kataoka, N., Tsujioaka, K., Kajiya, F., Yamashiro, T. et al.** (2008). The alteration of a mechanical property of bone cells during the process of changing from osteoblasts to osteocytes. *Bone* **43**, 19-24.
- Sugawara, Y., Kamioka, H., Honjo, T., Tezuka, K. and Takano-Yamamoto, T.** (2005). Three-dimensional reconstruction of chick calvarial osteocytes and their cell processes using confocal microscopy. *Bone* **36**, 877-83.
- Sukharev, S. I., Blount, P., Martinac, B. and Kung, C.** (1997). Mechanosensitive channels of *Escherichia coli*: the MscL gene, protein, and activities. *Annu Rev Physiol* **59**, 633-57.
- Sun, H., Ye, F., Wang, J., Shi, Y., Tu, Z., Bao, J., Qin, M., Bu, H. and Li, Y.** (2008). The upregulation of osteoblast marker genes in mesenchymal stem cells prove the osteoinductivity of hydroxyapatite/tricalcium phosphate biomaterial. *Transplant Proc* **40**, 2645-8.
- Suominen, H.** (2006). Muscle training for bone strength. *Aging Clin Exp Res* **18**, 85-93.
- Suzuki, N., Yoshimura, Y., Deyama, Y., Suzuki, K. and Kitagawa, Y.** (2008). Mechanical stress directly suppresses osteoclast differentiation in RAW264.7 cells. *Int J Mol Med* **21**, 291-6.
- Taaffe, D. R., Snow-Harter, C., Connolly, D. A., Robinson, T. L., Brown, M. D. and Marcus, R.** (1995). Differential effects of swimming versus weight-bearing activity on bone mineral status of eumenorrheic athletes. *J Bone Miner Res* **10**, 586-93.
- Tadokoro, S., Shattil, S. J., Eto, K., Tai, V., Liddington, R. C., de Pereda, J. M., Ginsberg, M. H. and Calderwood, D. A.** (2003). Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science* **302**, 103-6.
- Takagi, J.** (2007). Structural basis for ligand recognition by integrins. *Curr Opin Cell Biol* **19**, 557-64.
- Takahashi, Y. and Tabata, Y.** (2004). Effect of the fiber diameter and porosity of non-woven PET fabrics on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biomater Sci Polym Ed* **15**, 41-57.

## H. REFERENCES

- Takai, E., Landesberg, R., Katz, R. W., Hung, C. T. and Guo, X. E.** (2006). Substrate modulation of osteoblast adhesion strength, focal adhesion kinase activation, and responsiveness to mechanical stimuli. *Mol Cell Biomech* **3**, 1-12.
- Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T., Nishina, H., Isshiki, M., Yoshida, H., Saiura, A., Isobe, M., Yokochi, T., Inoue, J. et al.** (2002). Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell* **3**, 889-901.
- Tan, S. D., Bakker, A. D., Semeins, C. M., Kuijpers-Jagtman, A. M. and Klein-Nulend, J.** (2008). Inhibition of osteocyte apoptosis by fluid flow is mediated by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* **369**, 1150-4.
- Tan, S. D., de Vries, T. J., Kuijpers-Jagtman, A. M., Semeins, C. M., Everts, V. and Klein-Nulend, J.** (2007). Osteocytes subjected to fluid flow inhibit osteoclast formation and bone resorption. *Bone* **41**, 745-51.
- Tanaka-Kamioka, K., Kamioka, H., Ris, H. and Lim, S. S.** (1998). Osteocyte shape is dependent on actin filaments and osteocyte processes are unique actin-rich projections. *J Bone Miner Res* **13**, 1555-68.
- Tanaka, S. M., Alam, I. M. and Turner, C. H.** (2003a). Stochastic resonance in osteogenic response to mechanical loading. *Faseb J* **17**, 313-4.
- Tanaka, S. M., Li, J., Duncan, R. L., Yokota, H., Burr, D. B. and Turner, C. H.** (2003b). Effects of broad frequency vibration on cultured osteoblasts. *J Biomech* **36**, 73-80.
- Tang, L., Lin, Z. and Li, Y. M.** (2006). Effects of different magnitudes of mechanical strain on Osteoblasts in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **344**, 122-8.
- Tarbell, J. M., Weinbaum, S. and Kamm, R. D.** (2005). Cellular fluid mechanics and mechanotransduction. *Ann Biomed Eng* **33**, 1719-23.
- Tatsumi, S., Ishii, K., Amizuka, N., Li, M., Kobayashi, T., Kohno, K., Ito, M., Takeshita, S. and Ikeda, K.** (2007). Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metab* **5**, 464-75.
- Taylor, A. F., Saunders, M. M., Shingle, D. L., Cimbala, J. M., Zhou, Z. and Donahue, H. J.** (2007). Mechanically stimulated osteocytes regulate osteoblastic activity via gap junctions. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C545-52.
- Termine, J. D., Kleinman, H. K., Whitson, S. W., Conn, K. M., McGarvey, M. L. and Martin, G. R.** (1981). Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* **26**, 99-105.
- Teti, A. and Zallone, A.** (2009). Do osteocytes contribute to bone mineral homeostasis? Osteocytic osteolysis revisited. *Bone* **44**, 11-6.
- Tezuka, K., Nemoto, K., Tezuka, Y., Sato, T., Ikeda, Y., Kobori, M., Kawashima, H., Eguchi, H., Hakeda, Y. and Kumegawa, M.** (1994). Identification of matrix metalloproteinase 9 in rabbit osteoclasts. *J Biol Chem* **269**, 15006-9.
- Thi, M. M., Iacobas, D. A., Iacobas, S. and Spray, D. C.** (2007). Fluid shear stress upregulates vascular endothelial growth factor gene expression in osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci* **1117**, 73-81.
- Thian, E. S., Huang, J., Best, S. M., Barber, Z. H., Brooks, R. A., Rushton, N. and Bonfield, W.** (2006). The response of osteoblasts to nanocrystalline silicon-substituted hydroxyapatite thin films. *Biomaterials* **27**, 2692-8.
- Thiery, J. P., Duband, J. L. and Tucker, G. C.** (1985). Cell migration in the vertebrate embryo: role of cell adhesion and tissue environment in pattern formation. *Annu Rev Cell Biol* **1**, 91-113.

## H. REFERENCES

- Thomsen, J. S., Morukov, B. V., Vico, L., Alexandre, C., Saporin, P. I. and Gowin, W.** (2005). Cancellous bone structure of iliac crest biopsies following 370 days of head-down bed rest. *Aviat Space Environ Med* **76**, 915-22.
- Thorsen, K., Kristoffersson, A. O., Lerner, U. H. and Lorentzon, R. P.** (1996). In situ microdialysis in bone tissue. Stimulation of prostaglandin E2 release by weight-bearing mechanical loading. *J Clin Invest* **98**, 2446-9.
- Thouverey, C., Strzelecka-Kiliszek, A., Balcerzak, M., Buchet, R. and Pikula, S.** (2009). Matrix vesicles originate from apical membrane microvilli of mineralizing osteoblast-like Saos-2 cells. *J Cell Biochem* **106**, 127-38.
- Toma, C. D., Ashkar, S., Gray, M. L., Schaffer, J. L. and Gerstenfeld, L. C.** (1997). Signal transduction of mechanical stimuli is dependent on microfilament integrity: identification of osteopontin as a mechanically induced gene in osteoblasts. *J Bone Miner Res* **12**, 1626-36.
- Tombran-Tink, J. and Barnstable, C. J.** (2004). Osteoblasts and osteoclasts express PEDF, VEGF-A isoforms, and VEGF receptors: possible mediators of angiogenesis and matrix remodeling in the bone. *Biochem Biophys Res Commun* **316**, 573-9.
- Toomre, D., Keller, P., White, J., Olivo, J. C. and Simons, K.** (1999). Dual-color visualization of trans-Golgi network to plasma membrane traffic along microtubules in living cells. *J Cell Sci* **112 (Pt 1)**, 21-33.
- Totsukawa, G., Yamakita, Y., Yamashiro, S., Hartshorne, D. J., Sasaki, Y. and Matsumura, F.** (2000). Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol* **150**, 797-806.
- Towler, D. A.** (2008). The osteogenic-angiogenic interface: novel insights into the biology of bone formation and fracture repair. *Curr Osteoporos Rep* **6**, 67-71.
- Tran Van, P., Vignery, A. and Baron, R.** (1982). An electron-microscopic study of the bone-remodeling sequence in the rat. *Cell Tissue Res* **225**, 283-92.
- Turner, C. H.** (1998). Three rules for bone adaptation to mechanical stimuli. *Bone* **23**, 399-407.
- Turner, C. H., Owan, I. and Takano, Y.** (1995a). Mechanotransduction in bone: role of strain rate. *Am J Physiol* **269**, E438-42.
- Turner, C. H., Takano, Y., Owan, I. and Murrell, G. A.** (1996). Nitric oxide inhibitor L-NAME suppresses mechanically induced bone formation in rats. *Am J Physiol* **270**, E634-9.
- Turner, C. H., Yoshikawa, T., Forwood, M. R., Sun, T. C. and Burr, D. B.** (1995b). High frequency components of bone strain in dogs measured during various activities. *J Biomech* **28**, 39-44.
- Umemura, Y., Nagasawa, S., Honda, A. and Singh, R.** (2008). High-impact exercise frequency per week or day for osteogenic response in rats. *J Bone Miner Metab* **26**, 456-60.
- Usson, Y., Guignandon, A., Laroche, N., Lafage-Proust, M. H. and Vico, L.** (1997). Quantitation of cell-matrix adhesion using confocal image analysis of focal contact associated proteins and interference reflection microscopy. *Cytometry* **28**, 298-304.
- Vaananen, H. K. and Horton, M.** (1995). The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure. *J Cell Sci* **108 (Pt 8)**, 2729-32.
- Vainionpaa, A., Korpelainen, R., Vihriala, E., Rinta-Paavola, A., Leppaluoto, J. and Jamsa, T.** (2006). Intensity of exercise is associated with bone density change in premenopausal women. *Osteoporos Int*, 1-9.

## H. REFERENCES

- van't Hof, R. J. and Ralston, S. H.** (1997). Cytokine-induced nitric oxide inhibits bone resorption by inducing apoptosis of osteoclast progenitors and suppressing osteoclast activity. *J Bone Miner Res* **12**, 1797-804.
- van Bezooijen, R. L., Roelen, B. A., Visser, A., van der Wee-Pals, L., de Wilt, E., Karperien, M., Hamersma, H., Papapoulos, S. E., ten Dijke, P. and Lowik, C. W.** (2004). Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med* **199**, 805-14.
- van Bezooijen, R. L., Svensson, J. P., Eefting, D., Visser, A., van der Horst, G., Karperien, M., Quax, P. H., Vrieling, H., Papapoulos, S. E., ten Dijke, P. et al.** (2007). Wnt but not BMP signaling is involved in the inhibitory action of sclerostin on BMP-stimulated bone formation. *J Bone Miner Res* **22**, 19-28.
- van der Plas, A. and Nijweide, P. J.** (2005). JBMR anniversary classic. Isolation and purification of osteocytes. A van der Plas A, PJ Nijweide. Originally published in Volume 7, Number 4, pp 389-96 (1992). *J Bone Miner Res* **20**, 706-14.
- van Driel, M., Pols, H. A. and van Leeuwen, J. P.** (2004). Osteoblast differentiation and control by vitamin D and vitamin D metabolites. *Curr Pharm Des* **10**, 2535-55.
- Van Leeuwenhoek, A.** (1682). Letter to Robert Hooke, March 3rd. *Committee of Dutch scientists, 1948. The collected letters of Antoni Van Leeuwenhoek. Vol III*, 393-397.
- VandeVord, P. J., Nasser, S. and Wooley, P. H.** (2005). Immunological responses to bone soluble proteins in recipients of bone allografts. *J Orthop Res* **23**, 1059-64.
- Vatsa, A., Breuls, R. G., Semeins, C. M., Salmon, P. L., Smit, T. H. and Klein-Nulend, J.** (2008). Osteocyte morphology in fibula and calvaria --- is there a role for mechanosensing? *Bone* **43**, 452-8.
- Verborgt, O., Tatton, N. A., Majeska, R. J. and Schaffler, M. B.** (2002). Spatial distribution of Bax and Bcl-2 in osteocytes after bone fatigue: complementary roles in bone remodeling regulation? *J Bone Miner Res* **17**, 907-14.
- Verheyen, K., Price, J., Lanyon, L. and Wood, J.** (2006). Exercise distance and speed affect the risk of fracture in racehorses. *Bone* **39**, 1322-30.
- Verschueren, S. M., Roelants, M., Delecluse, C., Swinnen, S., Vanderschueren, D. and Boonen, S.** (2004). Effect of 6-month whole body vibration training on hip density, muscle strength, and postural control in postmenopausal women: a randomized controlled pilot study. *J Bone Miner Res* **19**, 352-9.
- Vezeridis, P. S., Semeins, C. M., Chen, Q. and Klein-Nulend, J.** (2006). Osteocytes subjected to pulsating fluid flow regulate osteoblast proliferation and differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* **348**, 1082-8.
- Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R. S. and Horwitz, A. R.** (2009). Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 778-90.
- Vico, L., Collet, P., Guignandon, A., Lafage-Proust, M. H., Thomas, T., Rehaillia, M. and Alexandre, C.** (2000). Effects of long-term microgravity exposure on cancellous and cortical weight-bearing bones of cosmonauts. *Lancet* **355**, 1607-11.
- Vico, L., Perrier, A. and Lafage-Proust, M. H.** (2008). Activité physique et squelette, Traité des maladies métaboliques osseuses de l'adulte. *Médecine-Sciences Flammarion*, 179-184.
- Vidal, N. O., Brandstrom, H., Jonsson, K. B. and Ohlsson, C.** (1998). Osteoprotegerin mRNA is expressed in primary human osteoblast-like cells: down-regulation by glucocorticoids. *J Endocrinol* **159**, 191-5.

## H. REFERENCES

- Vogel, V. and Sheetz, M.** (2006). Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 265-75.
- von Wichert, G., Jiang, G., Kostic, A., De Vos, K., Sap, J. and Sheetz, M. P.** (2003). RPTP-alpha acts as a transducer of mechanical force on alpha5/beta3-integrin-cytoskeleton linkages. *J Cell Biol* **161**, 143-53.
- Wahl, D. A. and Czernuszka, J. T.** (2006). Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair. *Eur Cell Mater* **11**, 43-56.
- Wang, J. H. and Thampatty, B. P.** (2006). An introductory review of cell mechanobiology. *Biomech Model Mechanobiol* **5**, 1-16.
- Wang, N., Butler, J. P. and Ingber, D. E.** (1993). Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* **260**, 1124-7.
- Wang, N., Naruse, K., Stamenovic, D., Fredberg, J. J., Mijailovich, S. M., Tolic-Norrelykke, I. M., Polte, T., Mannix, R. and Ingber, D. E.** (2001). Mechanical behavior in living cells consistent with the tensegrity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7765-70.
- Wang, Y., Cui, F. Z., Hu, K., Zhu, X. D. and Fan, D. D.** (2008). Bone regeneration by using scaffold based on mineralized recombinant collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **86**, 29-35.
- Wang, Y. L.** (1985). Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: possible role of treadmilling. *J Cell Biol* **101**, 597-602.
- Wang, Y. L.** (2007). Flux at focal adhesions: slippage clutch, mechanical gauge, or signal depot. *Sci STKE* **2007**, pe10.
- Waterman-Storer, C. M. and Salmon, E. D.** (1997). Actomyosin-based retrograde flow of microtubules in the lamella of migrating epithelial cells influences microtubule dynamic instability and turnover and is associated with microtubule breakage and treadmilling. *J Cell Biol* **139**, 417-34.
- Waterman-Storer, C. M., Worthylake, R. A., Liu, B. P., Burrige, K. and Salmon, E. D.** (1999). Microtubule growth activates Rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts. *Nat Cell Biol* **1**, 45-50.
- Webb, D. J., Parsons, J. T. and Horwitz, A. F.** (2002). Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again. *Nat Cell Biol* **4**, E97-100.
- Webster, T. J., Ergun, C., Doremus, R. H., Siegel, R. W. and Bizios, R.** (2000). Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *J Biomed Mater Res* **51**, 475-83.
- Webster, T. J., Siegel, R. W. and Bizios, R.** (1999). Osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Biomaterials* **20**, 1221-7.
- Wegner, A.** (1976). Head to tail polymerization of actin. *J Mol Biol* **108**, 139-50.
- Wetterwald, A., Hoffstetter, W., Cecchini, M. G., Lanske, B., Wagner, C., Fleisch, H. and Atkinson, M.** (1996). Characterization and cloning of the E11 antigen, a marker expressed by rat osteoblasts and osteocytes. *Bone* **18**, 125-32.
- Weyts, F. A., Bosmans, B., Niesing, R., van Leeuwen, J. P. and Weinans, H.** (2003). Mechanical control of human osteoblast apoptosis and proliferation in relation to differentiation. *Calcif Tissue Int* **72**, 505-12.
- Whalen, R. T., Carter, D. R. and Steele, C. R.** (1988). Influence of physical activity on the regulation of bone density. *J Biomech* **21**, 825-37.



## H. REFERENCES

- Wijelath, E. S., Murray, J., Rahman, S., Patel, Y., Ishida, A., Strand, K., Aziz, S., Cardona, C., Hammond, W. P., Savidge, G. F. et al.** (2002). Novel vascular endothelial growth factor binding domains of fibronectin enhance vascular endothelial growth factor biological activity. *Circ Res* **91**, 25-31.
- Winkler, D. G., Sutherland, M. K., Geoghegan, J. C., Yu, C., Hayes, T., Skonier, J. E., Shpektor, D., Jonas, M., Kovacevich, B. R., Staehling-Hampton, K. et al.** (2003). Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *Embo J* **22**, 6267-76.
- Wintrebert, P.** (1931). La rotation immédiate de l'oeuf pondu et la rotation d'activation chez *Discoglossus pictus* Otth. *Comptes Rend Soc Biol* **106**, 439-442.
- Wolf, G.** (1996). Function of the bone protein osteocalcin: definitive evidence. *Nutr Rev* **54**, 332-3.
- Wolff, J.** (1892). Das gesetz der transformation der knochen. *Berlin: Hirschwald Verlag von August*.
- Woodiel, F. N., Fall, P. M. and Raisz, L. G.** (1996). Anabolic effects of prostaglandins in cultured fetal rat calvariae: structure-activity relations and signal transduction pathway. *J Bone Miner Res* **11**, 1249-55.
- Woodruff, M. A., Jones, P., Farrar, D., Grant, D. M. and Scotchford, C. A.** (2007). Human osteoblast cell spreading and vinculin expression upon biomaterial surfaces. *J Mol Histol* **38**, 491-9.
- Worthylake, R. A. and Burridge, K.** (2003). RhoA and ROCK promote migration by limiting membrane protrusions. *J Biol Chem* **278**, 13578-84.
- Wozniak, M. A., Desai, R., Solski, P. A., Der, C. J. and Keely, P. J.** (2003). ROCK-generated contractility regulates breast epithelial cell differentiation in response to the physical properties of a three-dimensional collagen matrix. *J Cell Biol* **163**, 583-95.
- Wu, L. N., Ishikawa, Y., Sauer, G. R., Genge, B. R., Mwale, F., Mishima, H. and Wuthier, R. E.** (1995). Morphological and biochemical characterization of mineralizing primary cultures of avian growth plate chondrocytes: evidence for cellular processing of Ca<sup>2+</sup> and Pi prior to matrix mineralization. *J Cell Biochem* **57**, 218-37.
- Wung, B. S., Cheng, J. J., Chao, Y. J., Hsieh, H. J. and Wang, D. L.** (1999). Modulation of Ras/Raf/extracellular signal-regulated kinase pathway by reactive oxygen species is involved in cyclic strain-induced early growth response-1 gene expression in endothelial cells. *Circ Res* **84**, 804-12.
- Wuthier, R. E.** (1975). Effect of phospholipids on the transformation of amorphous calcium phosphate to hydroxapatite in vitro. *Calcif Tissue Res* **19**, 197-210.
- Wuthier, R. E., Majeska, R. J. and Collins, G. M.** (1977). Biosynthesis of matrix vesicles in epiphyseal cartilage. I. In vivo incorporation of <sup>32</sup>P orthophosphate into phospholipids of chondrocyte, membrane, and matrix vesicle fractions. *Calcif Tissue Res* **23**, 135-9.
- Xiao, G., Jiang, D., Thomas, P., Benson, M. D., Guan, K., Karsenty, G. and Franceschi, R. T.** (2000). MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa1. *J Biol Chem* **275**, 4453-9.
- Xiao, G., Wang, D., Benson, M. D., Karsenty, G. and Franceschi, R. T.** (1998). Role of the alpha2-integrin in osteoblast-specific gene expression and activation of the Osf2 transcription factor. *J Biol Chem* **273**, 32988-94.
- Xie, J., Baumann, M. J. and McCabe, L. R.** (2004). Osteoblasts respond to hydroxyapatite surfaces with immediate changes in gene expression. *J Biomed Mater Res A* **71**, 108-17.
- Xie, L., Jacobson, J. M., Choi, E. S., Busa, B., Donahue, L. R., Miller, L. M., Rubin, C. T. and Judex, S.** (2006). Low-level mechanical vibrations can influence bone resorption and bone formation in the growing skeleton. *Bone* **39**, 1059-66.

## H. REFERENCES

- Xie, L., Rubin, C. and Judex, S.** (2008). Enhancement of the adolescent murine musculoskeletal system using low-level mechanical vibrations. *J Appl Physiol* **104**, 1056-62.
- Xu, J., Wang, F., Van Keymeulen, A., Herzmark, P., Straight, A., Kelly, K., Takuwa, Y., Sugimoto, N., Mitchison, T. and Bourne, H. R.** (2003). Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils. *Cell* **114**, 201-14.
- Xu, J. L., Khor, K. A., Lu, Y. W., Chen, W. N. and Kumar, R.** (2008). Osteoblast interactions with various hydroxyapatite based biomaterials consolidated using a spark plasma sintering technique. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **84**, 224-30.
- Yamada, K. M. and Geiger, B.** (1997). Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 76-85.
- Yamada, K. M., Spooner, B. S. and Wessells, N. K.** (1970). Axon growth: roles of microfilaments and microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **66**, 1206-12.
- Yang, Q., McHugh, K. P., Patntirapong, S., Gu, X., Wunderlich, L. and Hauschka, P. V.** (2008). VEGF enhancement of osteoclast survival and bone resorption involves VEGF receptor-2 signaling and beta(3)-integrin. *Matrix Biol.*
- Yang, W., Harris, M. A., Heinrich, J. G., Guo, D., Bonewald, L. F. and Harris, S. E.** (2009). Gene expression signatures of a fibroblastoid preosteoblast and cuboidal osteoblast cell model compared to the MLO-Y4 osteocyte cell model. *Bone* **44**, 32-45.
- Yao, G. Q., Sun, B. H., Weir, E. C. and Insogna, K. L.** (2002). A role for cell-surface CSF-1 in osteoblast-mediated osteoclastogenesis. *Calcif Tissue Int* **70**, 339-46.
- Yao, Z., Lafage-Proust, M. H., Plouet, J., Bloomfield, S., Alexandre, C. and Vico, L.** (2004). Increase of both angiogenesis and bone mass in response to exercise depends on VEGF. *J Bone Miner Res* **19**, 1471-80.
- Yoneda, A., Multhaupt, H. A. and Couchman, J. R.** (2005). The Rho kinases I and II regulate different aspects of myosin II activity. *J Cell Biol* **170**, 443-53.
- Yoneda, A., Ushakov, D., Multhaupt, H. A. and Couchman, J. R.** (2007). Fibronectin matrix assembly requires distinct contributions from Rho kinases I and -II. *Mol Biol Cell* **18**, 66-75.
- Yoshigi, M., Hoffman, L. M., Jensen, C. C., Yost, H. J. and Beckerle, M. C.** (2005). Mechanical force mobilizes zyxin from focal adhesions to actin filaments and regulates cytoskeletal reinforcement. *J Cell Biol* **171**, 209-15.
- You, J., Reilly, G. C., Zhen, X., Yellowley, C. E., Chen, Q., Donahue, H. J. and Jacobs, C. R.** (2001a). Osteopontin gene regulation by oscillatory fluid flow via intracellular calcium mobilization and activation of mitogen-activated protein kinase in MC3T3-E1 osteoblasts. *J Biol Chem* **276**, 13365-71.
- You, J., Yellowley, C. E., Donahue, H. J., Zhang, Y., Chen, Q. and Jacobs, C. R.** (2000). Substrate deformation levels associated with routine physical activity are less stimulatory to bone cells relative to loading-induced oscillatory fluid flow. *J Biomech Eng* **122**, 387-93.
- You, L., Cowin, S. C., Schaffler, M. B. and Weinbaum, S.** (2001b). A model for strain amplification in the actin cytoskeleton of osteocytes due to fluid drag on pericellular matrix. *J Biomech* **34**, 1375-86.
- You, L., Temiyasathit, S., Lee, P., Kim, C. H., Tummala, P., Yao, W., Kingery, W., Malone, A. M., Kwon, R. Y. and Jacobs, C. R.** (2008). Osteocytes as mechanosensors in the inhibition of bone resorption due to mechanical loading. *Bone* **42**, 172-9.
- Yu, H., VandeVord, P. J., Mao, L., Matthew, H. W., Wooley, P. H. and Yang, S. Y.** (2009). Improved tissue-engineered bone regeneration by endothelial cell mediated vascularization. *Biomaterials* **30**, 508-17.

## H. REFERENCES

- Zaidel-Bar, R., Cohen, M., Addadi, L. and Geiger, B.** (2004). Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochem Soc Trans* **32**, 416-20.
- Zaidi, M., Moonga, B. S. and Huang, C. L.** (2004). Calcium sensing and cell signaling processes in the local regulation of osteoclastic bone resorption. *Biol Rev Camb Philos Soc* **79**, 79-100.
- Zambonin, G., Camerino, C., Greco, G., Patella, V., Moretti, B. and Grano, M.** (2000). Hydroxyapatite coated with heaptocyte growth factor (HGF) stimulates human osteoblasts in vitro. *J Bone Joint Surg Br* **82**, 457-60.
- Zamir, E., Katz, B. Z., Aota, S., Yamada, K. M., Geiger, B. and Kam, Z.** (1999). Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* **112 (Pt 11)**, 1655-69.
- Zanetti, N. C. and Solursh, M.** (1984). Induction of chondrogenesis in limb mesenchymal cultures by disruption of the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* **99**, 115-23.
- Zhang, J., Ryder, K. D., Bethel, J. A., Ramirez, R. and Duncan, R. L.** (2006a). PTH-induced actin depolymerization increases mechanosensitive channel activity to enhance mechanically stimulated Ca<sup>2+</sup> signaling in osteoblasts. *J Bone Miner Res* **21**, 1729-37.
- Zhang, O. H., Liang, X., Dong, Q., Chen, M., Xu, L. and Xia, L.** (2006b). [Effect of fluid shear stress time on the morphological change of rat polarized osteoclasts]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* **37**, 442-4, 494.
- Zhang, Q., Liang, X., Zhu, B., Dong, Q., Xu, L., Xia, L., Hu, J., Fu, J. and Liu, M.** (2006c). Effects of fluid shear stress on mRNA expression of carbonic anhydrase II in polarized rat osteoclasts. *Cell Biol Int* **30**, 714-20.
- Zhang, Q. H., Liang, X., Liu, M. T., Zhu, B. M. and Fu, J.** (2007). [Effects of fluid shear stress strength on mRNA expression of ATP6V1a1 in polarized osteoclasts]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* **25**, 396-8.
- Zhao, M.** (2009). Electrical fields in wound healing-An overriding signal that directs cell migration. *Semin Cell Dev Biol* **20**, 674-82.
- Zhu, X., Eibl, O., Scheideler, L. and Geis-Gerstorfer, J.** (2006). Characterization of nano hydroxyapatite/collagen surfaces and cellular behaviors. *J Biomed Mater Res A* **79**, 114-27.
- Ziegler, W. H., Liddington, R. C. and Critchley, D. R.** (2006). The structure and regulation of vinculin. *Trends Cell Biol* **16**, 453-60.
- Zouch, M., Jaffre, C., Thomas, T., Frere, D., Courteix, D., Vico, L. and Alexandre, C.** (2008). Long-term soccer practice increases bone mineral content gain in prepubescent boys. *Joint Bone Spine* **75**, 41-9.

# ANNEXES

## Articles

2010	"Apatite content of collagen materials dose-dependently increases pre-osteoblastic cell deposition of a cement line-like matrix", Perrier A, Dumas V, Linossier MT, Fournier C, Jurdic P, Rattner A, Vico L, Guignandon A., Bone, Mars 2010
2009	"The effect of dual frequency cyclic compression on matrix deposition by osteoblast-like cells grown in 3D scaffolds and on the modulation of VEGF variant expression", Dumas V., Perrier A., Malaval L., Laroche N., Guignandon A., Vico L., Rattner A., <i>Biomaterials, Mars 2009.</i>
2008	<b>Publication</b> "Traité des maladies métaboliques osseuses de l'adulte" chez Flammarion-Médecine-Sciences. Co-auteur du chapitre "Activité physique et squelette"

## Communications

2009	<b>Communication orale:</b> "Les complexes apatite-collagène comme mécano-mimétique pour les cellules souches" <i>Journée de l'IFRESIS (Saint-Etienne, 42)</i>
2009	<b>Poster:</b> "Apatite Collagen Complexes as mechano-mimetic materials for osteoblasts" Perrier A., Fournier C., Dumas V., Linossier M.T., Jurdic P., Vico L., Guignandon A. <i>51<sup>st</sup> American Society for Bone and Mineral Research (Denver, CO, USA)</i>
2009	<b>Poster:</b> "Extracellular matrix produced by osteoblasts cultured under microdeformations is favourable to osteogenic differentiation of MSCs" Dumas V., Guyomar D., Ducharne B., Perrier A., Guignandon A., Peyroche S., Vico L., Rattner A. <i>51<sup>st</sup> American Society for Bone and Mineral Research (Denver, CO, USA)</i>
2009	<b>Poster:</b> "Un remodelage osseux en boîte de Pétri" Perrier A., Fournier C., Dumas V., Linossier M.T., Jurdic P., Vico L., Guignandon A. <i>Journée de l'Ecole doctorale, Saint Etienne (42)</i>
2009	<b>Poster:</b> "Stimulations mécaniques et électriques sur les cellules ostéoformatrices: des substituts osseux piézoélectriques?" Dumas V., Guyomar D., Ducharne B., Perrier A., Guignandon A., Peyroche S., Vico L., Rattner A. <i>Journée de l'Ecole doctorale, Saint Etienne (42)</i>
2009	<b>Publication:</b> "The effect of dual frequency cyclic compression on matrix deposition by osteoblast-like cells grown in 3D scaffolds and on the modulation of VEGF variant expression", Dumas V., Perrier A., Malaval L., Laroche N., Guignandon A., Vico L., Rattner A., <i>Biomaterials, Mars 2009.</i>
2009	<b>Communication orale:</b> "Les complexes Apatite-Collagène: des matériaux mécano-mimétiques pour l'ostéoblaste?" <i>11<sup>èmes</sup> Journées Française de la Biologie des Tissus Minéralisés (Nice, 06)</i>
2008	<b>Poster:</b> "Les complexes apatite-collagène: entre déstructuration et suractivité de la cellule ostéoformatrice" <i>Journée de l'IFRESIS (Saint-Etienne, 42)</i>
2008	<b>Poster:</b> "Les contraintes mécaniques stimulent le remodelage d'os trabéculaire humain dans un système de culture <i>ex vivo</i> " <i>Journée de l'IFRESIS (Saint-Etienne, 42)</i>
2007	<b>Poster:</b> "Les contraintes mécaniques stimulent le remodelage d'os trabéculaire humain dans un système de culture <i>ex vivo</i> " <i>10<sup>èmes</sup> Journées Française de la Biologie des Tissus Minéralisés (Saint-Valéry sur Somme, 80)</i>
2006	<b>Poster:</b> "Les contraintes mécaniques modifient le métabolisme osseux dans un nouveau système de culture <i>ex vivo</i> d'os trabéculaire: le Zetos™" <i>Journée de l'IFR62 (Lyon, 69)</i>

## Résumé

Les cellules osseuses évoluent *in vivo* sur des matrices extracellulaires principalement formées de collagène de type I, dont le degré de minéralisation varie au cours du remodelage osseux. Le minéral de l'os, de structure apatitique, a été montré comme potentialisant les activités et modifiant la forme des cellules ostéoblastiques. Dans le but de comprendre les effets du micro-environnement matriciel sur les événements précurseurs à la phase de formation, nous avons émis l'hypothèse que ces modifications morphologiques pouvaient expliquer en elles-mêmes l'augmentation de l'activité des cellules ostéoblastiques, par augmentation de leur mécano-sensibilité, et que ce changement de préhension environnementale pouvait moduler la réponse aux stimulations mécaniques les plus fréquemment observées *in vivo*, à savoir les micro-vibrations.

Nous avons montré que sur les matériaux de collagène minéralisé ACC (Apatite Collagen Complex), les pré-ostéoblastes de la lignée MC3T3-E1 synthétisaient une matrice riche en ostéopontine, fibronectine et facteurs angiogéniques, de façon concomitante à une augmentation dépendante de la quantité de minéral de leur adhérence et de leur migration. Nous avons de plus observé une augmentation de la mécano-sensibilité (expression et turn-over augmentés des adhésions focales) des pré-ostéoblastes sur ACC. Finalement, nous avons établi que la réponse aux stimuli vibratoires était positive sur des matériaux non minéralisés (information) et négative sur ACC (stress) par rapports aux supports non stimulés, ce que nous avons interprété comme une hypersensibilité mécanique cellulaire lors de la culture sur ACC.

L'ensemble de ces données nous a montré que les modifications de mécanique cellulaire de pré-ostéoblastes cultivés sur ACC engendraient une fonctionnalisation spécifique ressemblant à celle observée *in vivo* dans la ligne cimentante, indispensable à la formation osseuse. D'autre part, les modifications de mécano-sensibilité observées sur ACC, en faisant un support mécano-mimétique et nous amenant à la comparaison du comportement cellulaire observé avec les ostéocytes, pourraient en elles-mêmes expliquer le dépôt matriciel spécifique et la réception modifiée aux signaux vibratoires. Dans notre but ultime de création d'un modèle de remodelage osseux *in vitro*, les paramètres physico-chimiques matriciels osseux et l'établissement de cocultures seront à prendre en compte.

## Abstract

Bone cells interact *in vivo* with extracellular matrices mainly formed of type-I collagen, for which the mineral content changes during the bone remodeling cycle. Bone mineral, which is apatitic in nature, was shown to respectively increase and alter the activity and form of osteoblasts. In order to study the micro-environmental effects of the matrix on the preliminary steps of bone formation, it was hypothesized that these morphological alterations could explain the increased activity of the osteoblastic cells by enhancing their mecano-sensibility. This altered mechano-sensibility could in turn modify the osteoblastic cells' response to the widely perceived micro-vibrations *in vivo*.

It was demonstrated that, on the collagen-mineralized materials ACC (Apatite Collagen Complex), MC3T3-E1 pre-osteoblastic cells formed a matrix rich in osteopontin, fibronectin and angiogenic factors. At the same time, an increase in cell adhesion and migration dependent on the mineral content was seen. We also observed an enhanced mechano-sensibility (increased focal adhesion gene expression and turn-over) when cells were cultured on ACC. Furthermore, it was found that the vibratory stimuli response was up-regulated on non-mineralized materials (information) and down-regulated on ACC (stress) vs. non-stimulated substrates. This observation was interpreted as a hypersensitization to environmental cues on ACC.

Taken together, these data have demonstrated that pre-osteoblastic cell mechanic alterations on ACC give rise to a specific functionalization mimicking what is observed *in vivo* in the cement line required for bone-formation. ACC-related mechano-sensibility changes, which render ACC a mechano-mimetic substrate and lead us to compare the observed cell behavior with osteocytes, could explain the specific matrix deposition and altered response to vibrations. The final goal of establishing a model for *in vitro* bone remodeling can only be fulfilled by considering physico-chemical parameters of the bone matrix and cocultures.

