



L'intégrine $\beta 1$ et de son régulateur ICAP-1 α dans l'ostéogenèse : rôle dans la prolifération, la différenciation et la fonction ostéoblastiques

Molly Brunner

► **To cite this version:**

Molly Brunner. L'intégrine $\beta 1$ et de son régulateur ICAP-1 α dans l'ostéogenèse : rôle dans la prolifération, la différenciation et la fonction ostéoblastiques. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes, 2013. Français. <NNT : 2013GRENV043>. <tel-01298426>

HAL Id: tel-01298426

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01298426>

Submitted on 6 Apr 2016

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biodiversité du développement et oncogénèse**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Molly BRUNNER

Thèse dirigée par **Daniel BOUVARD**

préparée au sein de l'équipe Dynamique de l'adhérence cellulaire et de la différenciation, Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche INSERM U823.

dans l'École Doctorale Chimie et Science du Vivant

L'intégrine $\beta 1$ et son régulateur ICAP-1 α dans l'ostéogénèse : rôle dans la prolifération, la différenciation et la fonction ostéoblastiques.

Thèse soutenue publiquement le **05 avril 2013**,
devant le jury composé de :

Mme Annie ANDRIEUX

Directeur de Recherche, Grenoble,

Président

Mme Marina GLUKHOVA

Directeur de Recherche, Paris,

Rapporteur

Mme Françoise REDINI

Directeur de Recherche, Nantes,

Rapporteur

Mr Joseph CAVERZASIO

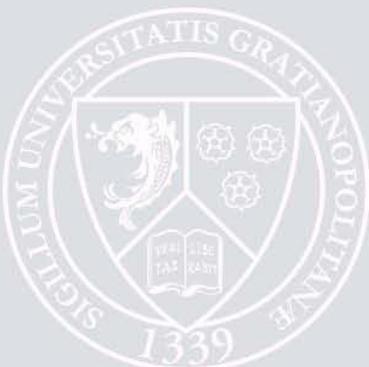
Professeur, Genève,

Membre

Mr Daniel BOUVARD

Chargé de Recherche, Grenoble,

Directeur de thèse



*Le processus de découverte scientifique équivaut, dans les faits, à
repousser sans cesse les limites de l'émerveillement...*

A. Einstein

SOMMAIRE

Sommaire	2
Avant-propos.....	6
Introduction	8
I. les intégrines : récepteurs majeurs de l'adhérence	9
I.1. Les intégrines, récepteurs majeurs de l'adhérence	9
I.1.1. La famille des intégrines	10
I.1.2. Importance physiologique.....	12
I.2. Les intégrines et leurs ligands	15
I.3. Contrôle de l'activation des intégrines.....	15
I.3.1. L'activation extracellulaire : cations divalents et ligand	19
I.3.2. Les régulateurs cytoplasmiques des intégrines.....	19
I.3.2.1. Les régulateurs positifs : Taline et Kindlines	19
I.3.2.2. Les régulateurs négatifs : ICAP-1 α et SHARPIN	21
I.4. Fonctions cellulaires régulées par les intégrines.....	22
I.4.1. L'adhérence cellulaire	22
I.4.2. L'organisation et le remodelage de la matrice.....	24
I.4.3. La prolifération cellulaire	26
I.4.4. La survie cellulaire	27
I.4.5. La différenciation cellulaire	28
II. la protéine ICAP-1 α : régulateur de l'intégrine β 1	28
II.1. Structure de la protéine ICAP-1 α	29
II.2. Régulation de la fonction d'ICAP-1 α , importance de la phosphorylation.....	31
II.3. La perte d'ICAP-1 α <i>in vivo</i> : un phénotype osseux.....	32
II.4. Fonctions de la protéine ICAP-1 α	32
II.4.1. ICAP-1 α , régulateur négatif de l'adhérence cellulaire et rôle dans la perception de l'environnement cellulaire	32
II.4.2. ICAP-1 α , régulateur de la prolifération cellulaire	34
II.4.3. Autres interacteurs protéiques et fonctions associées.....	34
III. Le tissu osseux :.....	35

III.1. Mise en place du tissu osseux : ossification endochondrale versus intramembraneuse	36
III.2. Croissance, modelage et remodelage osseux	37
III.2.1. Croissance osseuse	37
III.2.2. Modelage osseux.....	39
III.2.3. Remodelage osseux.....	39
III.3. Structure osseuse et composition de la matrice	41
IV. la lignée osteoblastique	43
IV.1. Les étapes de la différenciation ostéoblastique	43
IV.1.1. Origine de la lignée ostéoblastique.....	43
IV.1.2. Les étapes de la différenciation et marqueurs associés	44
IV.2. Les différents signaux régulant la prolifération et la survie ostéoblastique.....	46
IV.2.1. Les facteurs de croissance.....	46
IV.2.2. Le microenvironnement cellulaire	47
IV.3. Les différents signaux régulant la différenciation ostéoblastique.....	48
IV.3.1. Les facteurs solubles	48
IV.3.1.1. Les BMPs	48
IV.3.1.2. Les WNTs.....	49
IV.3.1.3. Les FGFs.....	50
IV.3.1.4. IHH.....	51
IV.3.1.5. La PTH et la PTHrP	51
IV.3.2. Le microenvironnement cellulaire	52
Résultats.....	54
Synthèse des résultats	55
I. La protéine ICAP-1α compétiteur de la kindline-2 pour l'intégrine β1 régule la formation des adhérences fibrillaires, la fibrillogénèse de fibronectine et par conséquent la minéralisation du tissu osseux.	57
I.1. Introduction.....	57
I.2. Synthèse des résultats.....	58
I.3. Discussion	61
I.3.1. ICAP-1 α et l'intégrine β 1, deux acteurs majeurs de l'assemblage de la matrice de fibronectine	61
I.3.2. L'organisation de la fibronectine, étape clé de la minéralisation ostéoblastique	65
I.3.3. La compaction ostéoblastique, processus dépendant de l'organisation de la matrice de fibronectine	65

I.4. Article: “Osteoblast mineralization requires β 1 integrin / ICAP-1-dependent fibronectin deposition”	66
II. L’intégrine β1, régulateur de la prolifération via l’activation du cofacteur de transcription YAP	88
II.1. Introduction.....	88
II.2. Résultats	91
II.3. Discussion	104
II.3.1. Les intégrines β 1, YAP et la progression tumorale.....	104
II.3.2. Les intégrines β 1, régulation de la prolifération et de l’apoptose	105
II.3.3. Comment les intégrines β 1 régulent-elles l’activité de YAP ?.....	106
II.3.3. Le dialogue ostéoblaste/ostéoclaste, quel rôle pour les intégrines ?.....	109
III. L’intégrine β1, un commutateur de la fonction ostéoblastique.....	111
III.1. Introduction.....	111
III.2. Résultats	114
III.3. Discussion	121
III.3.1. L’intégrine β 1, commutateur de la signalisation BMP-2	121
III.3.2. Quel point d’entrée pour la signalisation intégrine dans la voie BMP/SMADs ?	122
Discussion générale	125
Matériel et méthodes	129
I. Matériels	130
I.1. Protéines, Réactifs et Anticorps	130
I.1.1. Protéines.....	130
I.1.2. Réactifs	130
I.1.3. Anticorps	130
I.2. Bactéries	131
I.3. ADN plasmidique	131
II. Méthodes.....	131
II.1. Techniques de biologie animale.....	131
II.1.1. Production et génotypage des souris transgéniques	131
II.1.2. Marquage des squelettes à l’Alizarine et au Bleu d’Alcian	131
II.1.3. Histomorphométrie.....	132
II.1.4. Mesure de la densité minérale osseuse	132
II.1.5. Histologie et Immunohistochimie	132

II.1.6. Lysats protéiques à partir d'os longs.....	133
II.2. Techniques de biologie cellulaire	133
II.2.1. Génération de lignées cellulaires intégrine $\beta 1^{f/f}$ (wt) et intégrine $\beta 1^{-/-}$ ($\beta 1^{-/-}$)	133
II.2.2. Transfection et infection rétrovirale	134
II.2.3. Traitement des cellules	135
II.2.4. Immunofluorescences	135
II.2.5. Tests de prolifération	135
II.2.6. Tests de différenciation.....	136
II.3. Techniques de biochimie.....	136
II.3.1. Western-blot	136
II.3.2. Fractionnement cellulaire	137
II.3.3. PCR quantitative.....	137
II.3.4. Dosage de l'AMP cyclique	137
Bibliographie	138
Table des abréviations	153

AVANT-PROPOS

S'il m'était demandé ce qu'a été pour moi la thèse, je serais tentée de dépeindre cette expérience comme ce dont elle a été l'étude : le Développement.

S'il m'était demandé de définir ce qu'est le Développement, je décrirais un processus dynamique au cours duquel deux cellules à premier abord très différentes s'associent pour donner naissance à une entité unique au sein de laquelle chaque cellule nouvellement formée va évoluer et acquérir des caractéristiques propres de par son origine et de par le dialogue et les interactions qu'elle va mettre en place avec le reste de l'organisme en devenir. Le développement à l'échelle de la cellule est un processus d'intégration de données personnelles et environnementales dans le but de progresser, d'évoluer et de faire progresser l'ensemble harmonieusement.

L'aboutissement de cette thèse, humainement comme scientifiquement a été le fruit d'une évolution basée sur les interactions et le dialogue.

Le développement du tissu osseux et le processus de différenciation des cellules de la lignée ostéoblastique sont basés sur les mêmes lois. Afin d'aboutir à la formation d'un organe pleinement fonctionnel, les cellules initialement non-différenciées vont devoir intégrer des signaux provenant du milieu extérieur afin de se différencier harmonieusement avec le reste de l'organisme. Cette intégration des signaux provenant du milieu extracellulaire va en partie se faire grâce aux intégrines, senseurs des propriétés biochimiques et physiques du microenvironnement.

Cette thèse est donc le résultat d'interactions passionnées dans le but d'acquérir de nouvelles connaissances sur l'importance du dialogue entre la cellule et son microenvironnement via les intégrines, et les intégrer dans un ensemble plus global qui est la mise en place d'un tissu fonctionnel.

INTRODUCTION

I. LES INTEGRINES : RECEPTEURS MAJEURS DE L'ADHERENCE

Depuis de nombreuses années, il est reconnu que l'adhérence cellulaire et la perception de l'environnement sont des éléments essentiels pour la biologie de la cellule. En effet, il a été montré que l'interaction d'une cellule avec son environnement ou avec des cellules avoisinantes joue un rôle décisif sur de nombreux aspects du comportement cellulaire tels que la motilité, la prolifération, la survie ou encore la différenciation cellulaires. Ces différents aspects sont nécessaires à chaque étape du développement ainsi qu'à l'homéostasie tissulaire. A contrario, la perte ou la modification de cette adhérence conduisent dans la plupart des cas à des processus pathologiques tels que les pathologies de type LAD (Leucocytes Adhesion Deficiency), le syndrome de Kindler ou encore le développement tumoral et la formation de métastases.

L'adhérence d'une cellule à la matrice extracellulaire (MEC) fait intervenir trois acteurs majeurs : la matrice extracellulaire, les molécules d'adhérences présentes à la surface de la cellule et son cytosquelette.

La cellule va pouvoir adhérer à la MEC et/ou aux cellules avoisinantes grâce à nombre de molécules présentes à sa surface, dites molécules d'adhérence. Parmi celles-ci, on trouvera les intégrines : récepteurs majeurs de la MEC et pour certaines d'entre elles récepteurs d'interactions cellulaires ; les cadhérines, les sélectines et les immunoglobulines: récepteurs impliqués dans les interactions cellules/cellules ; les récepteurs à domaine discoïdine (DDR, Discoïdin Domain Receptor) ainsi que les protéoglycanes de type syndécans ou encore les récepteurs riches en leucines (LRPs, Leucine Rich Receptor) et les récepteurs au hyaluronane.

I.1. Les intégrines, récepteurs majeurs de l'adhérence

Découvertes dans les années 1980 par l'équipe du Dr. Ruoslahti (Pytela et al., 1985), les intégrines doivent leur nom au fait qu'elles constituent le lien principal entre le cytosquelette cellulaire et la matrice extracellulaire. Plus récemment, cette appellation s'est révélée d'autant plus appropriée qu'il a été montré une fonction importante des intégrines dans l'intégration des divers signaux provenant du microenvironnement cellulaire.

I.1.1. La famille des intégrines

Les intégrines sont les récepteurs majeurs de la MEC. Ce sont des récepteurs hétérodimériques transmembranaires, constitués de deux sous-unités : α et β , associées de manière non covalente. Chez les vertébrés, 18 sous-unités α et 8 sous-unités β ont été identifiées, pouvant former 24 récepteurs différents, chacun d'entre eux ayant une spécificité pour les ligands extracellulaires plus ou moins grande et une distribution tissulaire propre (Barczyk et al., 2009; Humphries et al., 2006; Hynes, 2002)(Figure I.1). Dans cette introduction seront décrites les intégrines, exceptée $\alpha 6\beta 4$ qui est une intégrine très particulière entrant dans la constitution des hémidesmosomes et étant relié aux filaments intermédiaires.

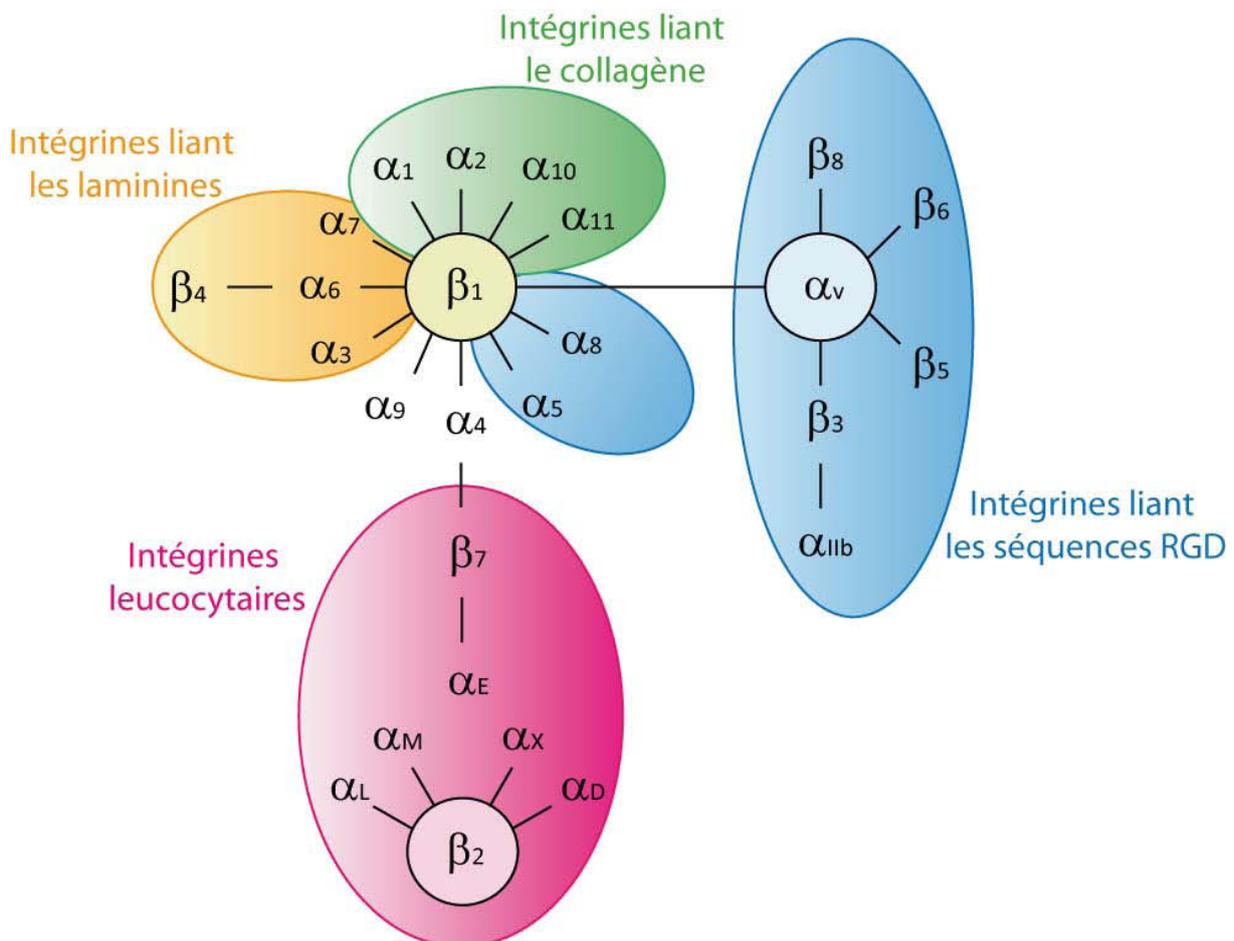


Figure I.1 : Les intégrines mammifères et leurs ligands. Les ligands contenant des séquences RGD sont entre autres la bone sialoprotéine (BSP), la fibronectine (FN), la néphronectine, l'ostéopontine (OPN), la thrombospondine et la vitronectine. Les ligands des intégrines leucocytaires regroupent la E-cadhérine, la VCAM (vascular cell adhesion molecule) et le facteur de von Willebrand (d'après (Margadant et al., 2011)).

Chaque sous-unité est composée d'un grand domaine extracellulaire, d'une région transmembranaire unique et pour la plupart des intégrines (excepté $\beta 4$) d'une courte

queue cytoplasmique non structurée, dépourvue d'activité enzymatique et capable d'interagir avec de nombreuses protéines intracellulaires (Aplin et al., 2001; Arnaout et al., 2007; Askari et al., 2009; Bennett et al., 2009; Luo et al., 2007). Les sous-unités α et β sont reliés par un pont salin dont la rupture constitue une des étapes de l'activation des intégrines. La fixation d'un ligand au niveau extracellulaire va en premier lieu permettre le « priming » des intégrines ou transition d'un état « inactif », où les sites d'interaction des intégrines avec leurs ligands sont masqués, vers un état « actif » où ces mêmes sites seront démasqués et pour lequel le recrutement de protéines liant l'actine telles la taline, la vinculine et les kindlines est permis (Ye et al., 2011). La fixation de la taline sur le domaine cytoplasmique de la sous-unité β , autorisée d'une part par le « priming » mais aussi par son activation par le PIP₂ entre autres (Goksoy et al., 2008), va permettre la rupture du pont salin et la pleine activation des intégrines. Ainsi, sous l'action de stimuli intracellulaires ou extracellulaires (voir paragraphe I.3), la plupart des intégrines vont subir un changement conformationnel autorisant l'interaction avec le ligand extracellulaire, de même que la connexion avec le cytosquelette d'actine. Les stimuli conduisant à l'activation des intégrines dépendent principalement du type d'intégrine et peuvent être de nature physique et/ou biochimique.

En plus de cette régulation au niveau du récepteur, l'activité des intégrines est aussi contrôlée via leur trafic entre les différentes régions de la membrane plasmique (rafts...), ainsi qu'entre les différents compartiments subcellulaires tels que les vésicules d'endo/exocytose ou les lysosomes pour leur dégradation. Selon le type d'intégrine, les voies de trafic empruntées ne seront pas les mêmes ainsi que les cinétiques d'endocytose et de trafic intracellulaire. Des motifs situés sur les domaines cytoplasmiques des sous-unités α et β sont connus pour recruter des GTPases et autres facteurs régulant ces mécanismes, ce qui explique des cinétiques différentes selon les intégrines étudiées. Ainsi, les intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$ présentent une endocytose rapide et constitutive alors que les intégrines $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha L\beta 2$ ne présentent pas d'endocytose ou une endocytose très lente (Caswell et al., 2009). Concernant leur trafic intracellulaire, les intégrines $\alpha v\beta 3$ sont internalisées et transitent via les endosomes précoces d'une manière PKD1-dépendante avant de retourner rapidement à la membrane plasmique en réponse à une stimulation par le PDGF, alors que les intégrines $\alpha 5\beta 1$, bien qu'endocytées rapidement, transitent par le compartiment de recyclage périnucléaire et sont donc recyclées plus lentement (Roberts et al., 2004; Woods et al.,

2004). Le trafic des intégrines est un processus important pour l'assemblage et le désassemblage des structures d'adhérence et pour la migration cellulaire. Il est maintenant reconnu que la manière dont les intégrines transitent dans les différents compartiments subcellulaires joue un rôle important dans la régulation de leur fonction. Des avancées récentes semblent indiquer qu'en plus de contrôler la distribution polarisée des intégrines, les différentes voies de trafic régulent aussi la manière dont les intégrines induisent leur signalisation, ainsi que celle des facteurs de croissance qui leur sont associés (Caswell et al., 2009).

Enfin, les intégrines sont aussi finement régulées au niveau de leur expression. Alors que les intégrines à chaîne $\beta 1$ sont ubiquitaires, les sous-unités α qui leur sont associées sont restreintes à certains types cellulaires. De même, les autres sous-unités β présentent une expression spécifique à certains types cellulaires. Par exemple, les intégrines $\beta 2$ sont principalement retrouvées dans les cellules sanguines, et l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ est principalement située sur les plaquettes et les mégacaryocytes (Humphries et al., 2006; Hynes, 2002).

I.1.2. Importance physiologique

De par leur rôle dans l'adhérence cellulaire, ainsi que dans la régulation de la survie et de la prolifération cellulaire via le contrôle de nombreuses voies de signalisation, les intégrines sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques au cours de l'embryogenèse et durant la vie adulte (Bouvard et al., 2001).

L'importance des intégrines au cours de l'embryogenèse a pu être mise en évidence par l'étude de souris transgéniques où l'inactivation génique a été réalisée pour une ou plusieurs sous-unités des intégrines. La délétion de chacun des 26 gènes des intégrines a été réalisée chez la souris mettant en évidence le rôle prépondérant de certaines sous-unités dans le développement embryonnaire. En effet, les délétions des sous-unités $\beta 1$ (Fassler and Meyer, 1995), $\alpha 5$ (Goh et al., 1997; Yang et al., 1993), $\alpha 4$ (Yang et al., 1995), $\beta 8$ (Zhu et al., 2002) et αv (Bader et al., 1998) entraînent chacune une létalité embryonnaire à des stades plus ou moins avancés du développement (Tableau I.). Les délétions des sous-unités $\alpha 3$ (DiPersio et al., 1997), $\alpha 6$ (Georges-Labouesse et al., 1996), $\alpha 9$ (Huang et al., 2000b), et $\beta 4$ (Dowling et al., 1996; van der Neut et al., 1996) entraînent pour leur part une létalité périnatale soulignant leur implication dans

l'organogenèse et la physiologie. Enfin, la délétion des autres sous-unités induit des défauts plus ou moins sévères et spécifiques de certains organes du fait de leur expression spécifique d'un ou plusieurs tissus. Ainsi, la délétion de la sous-unité α IIb (Tronik-Le Roux et al., 2000), l'intégrine plaquettaire majeure induit un défaut d'agrégation plaquettaire et de coagulation, alors que la délétion de la sous-unité β 3 (Hodivala-Dilke et al., 1999; McHugh et al., 2000) exprimée par de nombreux types cellulaires induit des défauts au niveau de nombreux tissus, entre autres une ostéopétrose due à un défaut ostéoclastique, des défauts plaquettaires et une anémie (Hodivala-Dilke et al., 1999; McHugh et al., 2000)(Tableau I.).

Gène	Viabilité	Phénotype général	Expression dans les ostéoblastes	Phénotype osseux	Références
Intégrines indispensables au développement embryonnaire					
β 1	L ; E5.5	Défaut dans la masse interne du blastocyste peu après implantation	oui	Formation osseuse réduite	(Fassler and Meyer, 1995; Phillips et al., 2008; Stephens et al., 1995)
β 8	L ; E12 - naissance	Défaut de vascularisation du placenta, hémorragie intracérébrale	non	ND	(Zhu et al., 2002)
α 4	L ; E11.5 - E14.5	Défaut de fusion de l'allantoïde et du chorion durant la formation du placenta, défaut de développement et hémorragie cardiaque	oui	Pas de défaut osseux reporté	(Yang et al., 1996; Yang et al., 1995)
α 5	L ; E10 - E11	Défaut de survie des cellules des crêtes neurales, défaut mésodermique	oui	Pas de défaut osseux reporté	(Goh et al., 1997; Yang et al., 1993)
α v	L ; E12 - naissance	Défaut de vascularisation du placenta, hémorragie intracérébrale et intra-intestinale, palais fendu	oui	Pas de défaut osseux reporté	(Bader et al., 1998; van der Flier et al., 2010)
Intégrines importantes pour l'organogenèse et la physiologie					
α 3	L ; naissance	Défauts rénaux, pulmonaires, cérébraux et cutanés	oui	Pas de défaut osseux reporté	(DiPersio et al., 1997; Gardner et al., 1996)
α 6	L ; naissance	Défauts d'organisation du cortex cérébral, défaut de la rétine et défaut cutané	ND	Pas de défaut osseux reporté	(Georges-Labouesse et al., 1998; Georges-Labouesse et al., 1996)
α 9	L ; P6-12	Chilothorax bilatéral et défaut de lymphogenèse	oui	Pas de défaut osseux reporté	(Huang et al., 2000b)
α 7	LP ; E12-E14	Défaut placentaire et défaut vasculaire embryonnaire, dystrophie musculaire chez l'adulte	oui	Pas de défaut osseux reporté	(Mayer et al., 1997)
α 8	LP ; naissance	Défaut de formation des reins, défaut de l'oreille interne et surdité	oui	Pas de défaut osseux reporté	(Littlewood Evans and Muller, 2000; Muller et al., 1997)
β 3	LP ; naissance	Thrombasténie, ostéopétrose	oui, faible dans les pré-ostéoblastes	Défaut de résorption osseuse par les ostéoclastes	(Hodivala-Dilke et al., 1999; McHugh et al., 2000)
β 4	LP ; naissance	Défaut cutané	non	ND	(Dowling et al., 1996; van der Neut et al., 1996)
α 1	V / F	Vascularisation tumorale réduite, défaut de formation de cale après fracture, Synthèse de collagène	oui	Polymorphisme lié à l'ostéoporose	(Ekholm et al., 2002; Gardner et al., 1996; Lee et al., 2007; Pozzi et al., 1998; Zemmyo et al., 2003)
α 2	V / F	Défaut d'adhésion plaquettaire sur collagène de type I, léger défaut rénal, défaut de complexité de	oui	Pas de défaut osseux reporté	(Chen et al., 2002; Girgert et al., 2010; Grenache et al., 2007)

branchement de la glande mammaire					
α10	V / F	Nanisme, légère chondrodysplasie	oui	Défaut des plaques de croissance	(Bengtsson et al., 2005)
α11	V / F	Nanisme, mortalité due à défaut de mise en place des incisives	oui	Pas de défaut osseux reporté	(Popova et al., 2007)
αx	V / F	Défaut des lymphocytes T, susceptibilité augmenté aux infections	oui (CSM)	Pas de défaut osseux reporté	(Ren et al., 2004; Wu et al., 2004)
αL	V / F	Défaut de recrutement leucocytaire et de rejection tumorale. Défaut ostéoclastique.	ND	Défaut ostéoclastique	(Schmits et al., 1996; Shier et al., 1996)
αd	V / F	Réduction de la réponse des lymphocytes T à l'enterotoxine staphylococcale	oui (CSM)	Pas de défaut osseux reporté	(Wu et al., 2004)
αm	V / F	Défaut de phagocytose et d'apoptose des neutrophiles.	ND	Pas de défaut osseux reporté	(Coxon et al., 1996; Lu et al., 1997)
α2b	V / F	Thrombasténie.	non	Pas de défaut osseux reporté	(Tronik-Le Roux et al., 2000)
β2	V / F	Défaut de recrutement leucocytaire, infections cutanées, ostéoporose	oui (CSM)	Défaut de différenciation ostéoblastique	(Miura et al., 2005; Wilson et al., 1993)
β5	V / F	Pas de phénotype apparent	oui	Pas de défaut osseux reporté	(Huang et al., 2000a)
β6	V / F	Défaut d'activation du TGF, asthme, calvitie juvénile.	non	ND	(Huang et al., 1996; Munger et al., 1999)
β7	V / F	Défaut des plaque de Peyer, réduction des lymphocytes intraépithéliaux.	non	ND	(Wagner et al., 1996)

Tableau I : Les différentes sous-unités d'intégrine et phénotypes induits par leur délétion chez la souris. (L: létal ; LP: létalité partielle; V: viable; F: fertile; CSM: cellules souches mésenchymateuses; ND : non déterminé).

Afin d'étudier le rôle joué par les intégrines dont la délétion germinale est létale à l'état embryonnaire, des délétions conditionnelles de certaines sous-unités ont été réalisées dans certains organes. Par exemple, ceci a permis de mettre en évidence le rôle des intégrines à sous-unité β1 dans la mise en place et le maintien de l'épithélium tubulaire rénal (Zhang et al., 2009) ainsi que dans la polarité des cellules endothéliales et la formation de la lumière artériolaire (Zovein et al., 2010).

Finalement, l'importance des intégrines dans le développement et la physiologie tissulaire est mise en évidence par l'existence de pathologies liées à la perte ou le gain d'expression de certaines intégrines, leur dérégulation ou encore la modification de leurs ligands extracellulaires. On citera parmi ces pathologies le syndrome LAD (Leucocyte Adhesion Deficiency) de type I (lié à la perte de la sous-unité β2 des intégrines) et de type III (liée à la perte de fonction de la Kindline-3, molécule régulatrice des intégrines), une forme de dystrophie musculaire congénitale (liée à la perte de l'intégrine α7) (Mayer et al., 1997) ou encore le développement tumoral et la formation de métastases (Schneider et al., 2011; White et al., 2004).

Les intégrines forment donc une famille de molécules dont l'importance physiologique n'est plus à démontrer et qui malgré leur apparente redondance fonctionnelle présentent pour certaines d'entre elles des spécificités tissulaires et de substrat leur conférant une importance physiologique indiscutable.

I.2. Les intégrines et leurs ligands

La majorité des intégrines ont pour ligand des molécules de la MEC mais certaines d'entre elles vont également interagir avec des ligands solubles présents dans la MEC ou libérés lors de sa dégradation (fibrinogène, angiostatine...) ou encore avec des récepteurs membranaires présents à la surface des cellules voisines (E-cadherin, ICAM (Intercellular Adhesion Molecule), ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease)).

Malgré la grande complexité des ligands des intégrines, on retrouve chez chacun d'entre eux des motifs de reconnaissance basés sur un résidu aminé acide, aspartique (D) dans les motifs RGD, LVD, RTD ou KQAGD ou glutamique (E).

L'interaction des intégrines avec leurs ligands est basée sur un complexe ternaire impliquant les extrémités N-terminales des sous-unités α et β , les résidus acide aspartique ou glutamique présents dans le ligand et des cations divalents. Alors que le magnésium (Mg^{2+}) et le manganèse (Mn^{2+}) favorisent la liaison physiologique du ligand sur les intégrines, le calcium (Ca^{2+}) est un inhibiteur de cette interaction.

Bien que plusieurs types d'intégrines puissent se trouver sur une même cellule et interagir avec un même ligand, leurs fonctions sont souvent différentes et ainsi leur apparente redondance fonctionnelle n'est souvent pas totale. De même, des ligands différents bien qu'interagissant avec les mêmes intégrines peuvent induire des signalisations et des réponses cellulaires différentes.

I.3. Contrôle de l'activation des intégrines

Contrairement aux autres types de récepteurs qui activent des voies de signalisation en réponse à la liaison d'un ligand, l'activation des intégrines est un phénomène plus complexe. Cette activation se caractérise par le « priming » de l'intégrine ou la transition

entre deux états conformationnels ayant des affinités différentes pour le ligand, ainsi que par la propagation de signaux intracellulaires induite par la liaison au ligand, que l'on appellera « activation » (Humphries et al., 2003). Cette activation particulière des intégrines va donc permettre de réguler d'une part des voies de signalisation intracellulaires, on parlera alors de signalisation « entrante » ou « outside-in », et d'autre part l'interaction avec les ligands extracellulaires donc l'adhérence et le remodelage de la matrice, on parlera alors de signalisation « sortante » ou « inside-out » (Figure I.2).

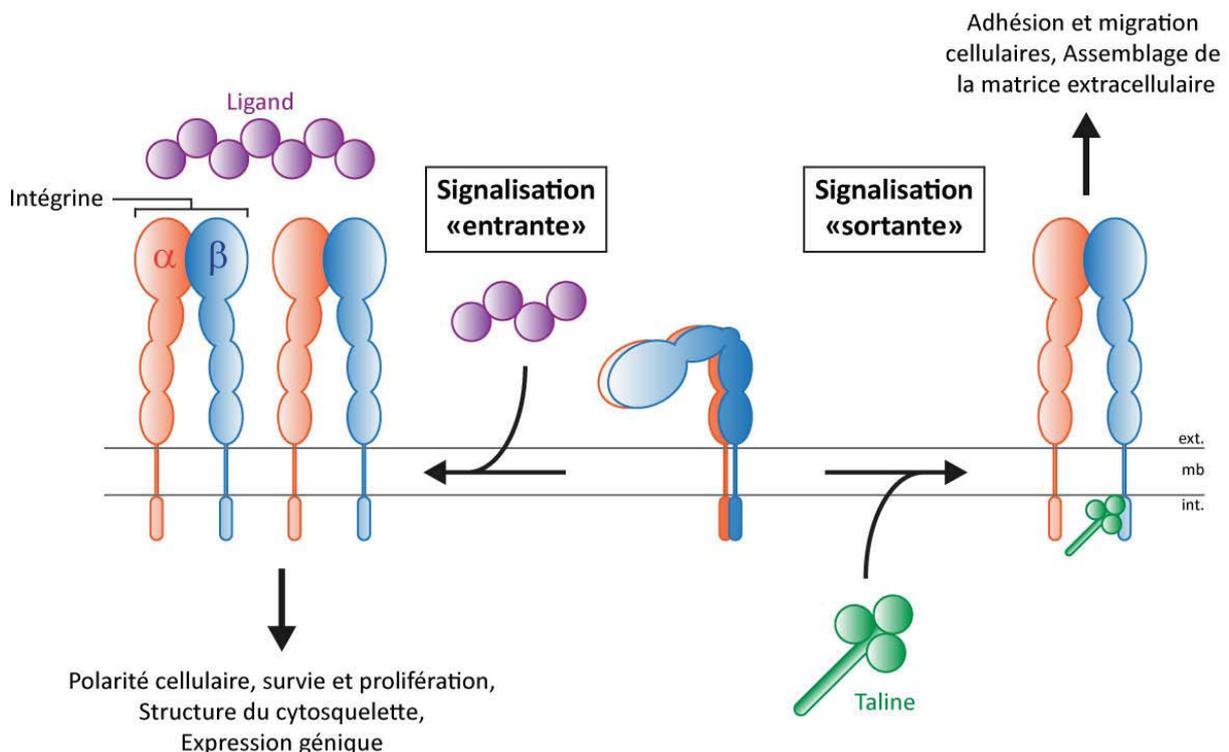


Figure I.2 : L'activation des intégrines et leur signalisation bidirectionnelle. Les deux directions de la signalisation dépendante des intégrines ont des conséquences biologiques différentes. Au cours de la signalisation « sortante », un activateur intracellulaire, tel que la taline ou la kindline, se lie au domaine cytoplasmique de la sous-unité β et induit des changements conformationnels conduisant à une augmentation de l'affinité pour les ligands extracellulaires. On parle alors d'activation de l'intégrine. Les intégrines fonctionnent aussi comme des récepteurs traditionnels en transmettant des informations provenant du milieu extracellulaire via une signalisation « entrante ». La liaison de l'intégrine à ses ligands extracellulaires modifie sa conformation et comme beaucoup de ses ligands sont multivalents, ils induisent le regroupement ou « clustering » de plusieurs hétérodimères d'intégrines. La combinaison de ces deux éléments induit une signalisation intracellulaire contrôlant la polarité cellulaire, la structure du cytosquelette, l'expression génique, la survie et la prolifération cellulaires. Bien que l'on sépare conceptuellement les signalisations « entrante » et « sortante », ces deux processus sont le plus souvent interconnectés et l'un ne va généralement pas sans l'autre (d'après (Shattil et al., 2010)).

L'importance de la régulation de l'activité des intégrines ou phénomène d'activation/inactivation est soulignée par l'existence de différentes pathologies associées à des déficits ou des mutations de certaines protéines responsables de cette

régulation, ou des mutations des intégrines elles-mêmes affectant leur activation. On pourra citer entre autres la thrombasténie de Glanzmann caractérisée par un défaut d'agrégation plaquettaire dû à une mutation de l'intégrine $\beta 3$ empêchant son activation (Chen et al., 1992). De même, le syndrome LAD-III (Leucocyte Adhesion Deficiency type III) dans lequel les leucocytes et les plaquettes présentent un niveau normal d'intégrines mais n'expriment pas la kindline-3, une protéine nécessaire à la régulation des intégrines est dû à un défaut d'activation des intégrines. Cette perte d'expression de la kindline-3 induit des défauts d'adhérence des cellules de l'immunité et des plaquettes entraînant des infections et des saignements récurrents (Kinashi et al., 2004). La perte de fonction du gène codant la Kindline-1, dont l'expression est épithéliale, est à l'origine du syndrome de Kindler, une pathologie de la peau caractérisée par une perte d'adhérence des kératinocytes de la couche basale de l'épiderme induisant un décollement de la peau (Ashton et al., 2004). Plus spécifiquement, la régulation de l'activité des intégrines semble être un processus important dans la mise en place et la physiologie osseuses comme en attestent les phénotypes obtenus chez les souris délétées spécifiquement pour les gènes des interacteurs des intégrines dans le tissu osseux (Tableau II.).

	Fonction cellulaire	Exprimé dans les ostéoblastes	Partenaire intégrinique	Phénotype osseux	Références
Activateurs des intégrines					
Taline	Cytosquelette, AF	OUI	$\beta 1, \beta 2, \beta 3, \beta 5, \beta 7$	E, pas de modèle murin délété au niveau osseux	(Calderwood et al., 2003; Horwitz et al., 1986; Monkley et al., 2000; Pfaff et al., 1998)
Kindline 1	Cytosquelette, AF	NON	$\beta 1, \beta 3$	ND	(Kloeker et al., 2004; Ussar et al., 2008)
Kindline 2	Cytosquelette, AF	OUI	$\beta 1, \beta 3$	E, pas de modèle murin délété au niveau osseux	(Brunner et al., 2011; Montanez et al., 2008)
Kindline 3	Cytosquelette, AF	NON	$\beta 1, \beta 3, \beta 2$	Défaut de résorption ostéoclastique	(Moser et al., 2008)
CD98	Signalisation	OUI	$\beta 1$	E, pas de modèle murin délété au niveau osseux	(Fenczik et al., 1997; Fenczik et al., 2001; Tsumura et al., 2003; Zent et al., 2000)
Inhibiteurs des intégrines					
ICAP-1	Régulateur des intégrines	OUI	$\beta 1$	Défaut de minéralisation, différenciation, prolifération	(Bouvard et al., 2007; Brunner et al., 2011; Chang et al., 1997; Vuori and Ruoslahti, 1994; Zhang and Hemler, 1999)
Sharpin	Régulateur des intégrines, NF κ b	OUI	Toutes les α	Défaut de minéralisation	(Rantala et al., 2011; Xia et al., 2011)
Filamine	Régulateur des intégrines, cytosquelette	OUI	$\beta 1, \beta 2, \beta 3, \beta 7$	Pathologie osseuse humaine; réduction de la masse osseuse (FLNB)	(Zhou et al., 2007)
Autres protéines liants les intégrines					
α -actinine (1-4)	Cytosquelette, AF	OUI	$\beta 1, \beta 2, \beta 3$	réduction de la masse osseuse (α -actinine 3)	(Otey et al., 1990; Otey et al., 1993; Pavalko and LaRoche, 1993; Yang et al., 2011)

Myosine X	Filopodes	OUI	$\beta 1, \beta 3, \beta 5$	Pas de modèle murin	(Jenkins et al., 1998; Sajid et al., 2000; Zhang et al., 2004)
Skelemin	Cytosquelette	NON	$\beta 1, \beta 3$	NA	(Reddy et al., 1998)
Tensine (1-4)	Cytosquelette	OUI	$\beta 1, \beta 3, \beta 5, \beta 7$	réduction de la masse osseuse (tensin 3)	(Calderwood et al., 2003; Chiang et al., 2005; McCleverty et al., 2007)
14-3-3	Signalisation	OUI	$\beta 1, \beta 2, \beta 3$	NA	(Fagerholm et al., 2005; Han et al., 2001)
TAP20/ $\beta 3$ -endonexin/NRIF3	Facteur de transcription, noyau	OUI	$\beta 3, \beta 5$	Pas de modèle murin	(Shattil et al., 1995; Tang et al., 1999)
Dab1	Endocytose	NON	$\beta 1, \beta 2, \beta 3, \beta 5, \beta 7$	NA	(Calderwood et al., 2003)
Dab2	Endocytose	OUI	$\beta 3, \beta 5$	E, pas de modèle murin délété au niveau osseux	(Calderwood et al., 2003)
Dok(1-2)	Signalisation	OUI	$\beta 2, \beta 3, \beta 5, \beta 7$	Ostéopénie, augmentation de l'activité ostéoclastique	(Calderwood et al., 2003; Kawamata et al., 2011)
FHL2	Cytosquelette, cofacteur de transcription	OUI	$\beta 1, \beta 2, \beta 3, \beta 6$	Ostéopénie, réduction de l'activité ostéoblastique	(Gunther et al., 2005; Samson et al., 2004; Wixler et al., 1999)
FHL3	Cytosquelette, cofacteur de transcription	ND	$\beta 1$	Pas de modèle murin	(Samson et al., 2004)
Grb2	Signalisation	OUI	$\beta 3$	E, pas de modèle murin délété au niveau osseux	(Blystone et al., 1996; Law et al., 1996)
IAP/CD47	Signalisation	OUI	$\beta 3, \alpha 2 \beta 1$	réduction de l'activité ostéoblastique	(Brown et al., 1990; Maile et al., 2011)
Jab1	Cofacteur de transcription	OUI (ostéoprécurseurs)	$\beta 2$	E, pas de modèle murin délété au niveau osseux	(Bianchi et al., 2000)
Mélusine	Signalisation	NON	$\beta 1$	NA	(Brancaccio et al., 1999)
Numb	Signalisation, endocytose	OUI	$\beta 3, \beta 5$	E, pas de modèle murin délété au niveau osseux	(Calderwood et al., 2003)
ILK	Cytosquelette	OUI	$\beta 1, \beta 3$	E, pas de modèle murin délété au niveau osseux	(Hannigan et al., 1996)
Paxilline	Cytosquelette, FA, signalisation	OUI	$\beta 1, \beta 3$	E, pas de modèle murin délété au niveau osseux	(Schaller et al., 1995)
Rack1	Cytosquelette, AF, signalisation	OUI	$\beta 1, \beta 2, \beta 5$	E, pas de modèle murin délété au niveau osseux	(Liliental and Chang, 1998)
Eps8	Cytosquelette	OUI	$\beta 1, \beta 3, \beta 5$	Pas de phénotype osseux rapporté	(Calderwood et al., 2003)
Shc	Signalisation	OUI	$\beta 3, \beta 4$	NA	(Law et al., 1996)
Merline	Signalisation	OUI	$\beta 1$	E, pas de modèle murin délété au niveau osseux, ostéosarcome	(McClatchey et al., 1998; McClatchey et al., 1997; Obremski et al., 1998; Stemmer-Rachamimov et al., 1998)
IRS-1	Signalisation	OUI	$\alpha \nu \beta 3$	Ostéopénie, dynamique osseuse réduite	(Ogata et al., 2000; Vuori and Ruoslahti, 1994)
Wait1	Méthylation des histones	OUI	$\beta 7$	Pas de phénotype osseux rapporté	(Rietzler et al., 1998)
Catalytique					
Src	Signalisation	OUI	$\beta 3$	Ostéopérose (défaut ostéoclastique, augmentation de l'activité ostéoblastique)	(Arias-Salgado et al., 2003; Arias-Salgado et al., 2005; Marzia et al., 2000; Soriano et al., 1991)
Yes	Signalisation	OUI	$\beta 1, \beta 2, \beta 3$	Pas de phénotype osseux rapporté	(Arias-Salgado et al., 2005)
Cytohésine 1	Signalisation	ND	$\beta 2$	Pas de phénotype osseux rapporté	(Kolanus et al., 1996)
FAK	Signalisation	OUI	$\beta 1, \beta 2, \beta 3, \beta 5$	Retard dans la réparation osseuse	(Kim et al., 2007; Leucht et al., 2007; Schaller et al., 1995)
ERK1/2	Signalisation	OUI	$\beta 6$	Défaut de différenciation ostéoblastique	(Ahmed et al., 2002; Matsushita et al., 2009)
Fyn	Signalisation	OUI	$\beta 1, \beta 2, \beta 3$	Pas de phénotype osseux rapporté	(Arias-Salgado et al., 2005)
PKD1	Signalisation	OUI	$\beta 1, \beta 3$	Ostéopénie, défaut de mécanotransduction ostéocytaire	(Boulter et al., 2001; Medeiros et al., 2005; Woods et al., 2004; Xiao et al., 2011; Xiao et al., 2009)
PP2A	Signalisation	OUI	$\beta 1$	E, pas de modèle murin délété au niveau osseux	(Kim et al., 2004)

Tableau II : Les différents partenaires des intégrines et phénotypes osseux induits par leur délétion chez la souris. (E: létalité embryonnaire; NA: non applicable; AF: adhérences focales).

I.3.1. L'activation extracellulaire : cations divalents et ligand

L'activation des intégrines peut être induite par l'interaction avec leur ligand sur leur domaine extracellulaire. En effet, de petits peptides tels que les RGD ou des anticorps activateurs dits LIBS (Ligand Induced Binding Site) peuvent induire le priming ou changement conformationnel des intégrines. De plus, il a pu être montré que cette modification conformationnelle était propagée jusqu'aux domaines cytoplasmiques des sous-unités α et β (Du et al., 1991; Frelinger et al., 1991; Kim et al., 2003).

La liaison d'un ligand sur une intégrine est un phénomène dépendant des cations divalents et la liaison de cations différents résulte en des niveaux de liaison du ligand différents. L'étude de l'interaction entre l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ et son ligand la fibronectine a permis de mettre en évidence les effets du Mn^{2+} , du Mg^{2+} et du Ca^{2+} sur la liaison au ligand (Mould et al., 1995). Chaque cation a un effet spécifique sur la capacité de liaison au ligand : le Mn^{2+} promeut une liaison au ligand de forte affinité, le Mg^{2+} pour sa part va permettre une liaison de faible affinité avec le ligand alors que le Ca^{2+} va avoir un effet inhibiteur et empêchera la liaison avec le ligand.

Toutefois, dans le cas d'une activation de l'intégrine par les cations divalents, le pont salin n'est pas rompu et les domaines transmembranaires et cytoplasmiques ne sont pas séparés (Kim et al., 2003; Luo et al., 2004).

I.3.2. Les régulateurs cytoplasmiques des intégrines

La rupture du pont salin reliant les deux sous-unités des intégrines va nécessiter l'action de protéines régulatrices qui, par leur liaison sur les domaines cytoplasmiques des sous-unités α ou β permettront une régulation fine et rapide de l'interaction avec le ligand extracellulaire. On parlera alors de signalisation « inside-out ».

I.3.2.1. Les régulateurs positifs : Taline et Kindlines

La taline est une protéine de 270kDa impliquée dans la liaison des intégrines au cytosquelette d'actine. Elle est constituée d'une tête globulaire pouvant lier le motif membranaire proximal NPxY du domaine cytoplasmique de la sous-unité β des intégrines (Figure I.3). Cette interaction entre la tête de la taline et la queue cytoplasmique de la sous-unité β des intégrines est nécessaire à l'activation des intégrines (Calderwood et al., 1999). La taline peut se trouver dans un état inactif ou replié dans lequel le domaine FERM (Four-point-one protein, Ezrin, Radixin, Moesin) situé dans sa partie N-terminale est masqué par l'interaction entre les domaines C- et N-terminaux de la taline. L'activation de la taline va donc nécessiter soit sa protéolyse par la calpaïne (Yan et al., 2001), soit un changement conformationnel induit par liaison de polyphosphoinositides de type PI4,5P(2) (Martel et al., 2001). La phosphorylation de la sous-unité β de l'intégrine sur son motif NPxY proximal membranaire permettrait pour sa part la régulation négative de l'interaction entre la taline et l'intégrine, inhibant ainsi l'activation de cette dernière (Oxley et al., 2008). Des données structurales ont permis de proposer un modèle d'activation de l'intégrine par la taline (Calderwood et al., 2002). Cette activation se ferait en deux étapes. Une première interaction entre le motif NPxY de la région proximale membranaire et le domaine phosphotyrosine binding (PTB) de la tête de la taline permettrait de fournir un point d'ancrage solide entre la taline et l'intégrine (Figure I.3). Cette première interaction ne permettrait toutefois pas la rupture du pont salin et la dissociation entre les deux sous-unités de l'intégrine. L'intégrine reste donc après cette première étape dans un état de faible affinité pour le ligand. Une seconde étape serait donc nécessaire à la rupture du pont salin et à la séparation des domaines transmembranaires des deux sous-unités. Cette seconde étape se ferait par la liaison du domaine FERM de la taline à un second site de la région membranaire proximale, tout en maintenant sa première interaction. Bien que la taline soit, à l'heure actuelle, la seule protéine connue comme induisant directement le changement conformationnel des intégrines nécessaire à leur activation, d'autres molécules participent aux événements moléculaires conduisant à l'activation des intégrines.

Les kindlines, bien que n'activant pas directement les intégrines, jouent un rôle prépondérant et synergique de la taline dans leur activation. La famille des kindlines se compose de trois membres : kindline-1, -2 et -3. Le profil d'expression de chacune des kindlines est spécifique : la kindline-1 est exprimée dans les épithéliums, la kindline-2

est beaucoup plus ubiquitaire et la kindline-3 est exprimée principalement dans les cellules hématopoïétiques et endothéliales (Ussar et al., 2006). Les kindlines contiennent en partie C-terminale un domaine FERM proche de celui de la taline contenant un motif PTB-like permettant l'interaction avec les intégrines $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 3$. La partie N-terminale des kindlines contient pour sa part des sites de liaison à des protéines telles que ILK (Integrin Linked Kinase) ou la migfiline permettant la connexion des kindlines et donc indirectement des intégrines au cytosquelette d'actine (Tu et al., 2003). Les kindlines interagissent via leur domaine PTB-like avec le motif NxxY distal des intégrines (Figure I.3). Toutefois, une séquence S/T-T située en amont du NxxY est également nécessaire à l'interaction entre l'intégrine et la kindline. Les substitutions des acides aminés de ces deux sites par des alanines bloquent l'interaction avec la kindline, suggérant que le recrutement de la kindline est contrôlé par la phosphorylation de la sous-unité β de l'intégrine. La fixation de la kindline sur l'intégrine aurait un effet synergique sur l'activation de cette dernière par la taline. Le mode d'action exact de la kindline n'est pas encore tout à fait élucidé. Toutefois un modèle semble émerger où la kindline en se fixant sur la sous-unité β réduirait la flexibilité de sa queue cytoplasmique, permettant ainsi une interaction optimale avec la taline. De plus la kindline en se fixant sur l'intégrine pourrait entrer en compétition avec d'autres interacteurs des intégrines.

1.3.2.2. Les régulateurs négatifs : ICAP-1 α et SHARPIN

Les régulateurs négatifs des intégrines sont de plus en plus étudiés et un concept émergent est l'importance de ces régulateurs pour la fonction des intégrines. La majorité d'entre eux régulent négativement la fixation de la taline sur la sous-unité β des intégrines. Parmi ces derniers, on pourra citer la protéine Dok1 qui en se fixant sur l'intégrine $\beta 3$ phosphorylée empêche la liaison de la taline (Oxley et al., 2008). De même, la filamine, après avoir subi un changement conformationnel dû aux forces intracellulaires, interagit avec l'intégrine et masque le site de liaison de la taline entraînant l'inactivation de l'intégrine (Kiema et al., 2006; Pentikainen and Ylanne, 2009). La protéine ICAP-1 (Integrin Cytoplasmic domain Associated Protein-1) régule elle aussi négativement l'activation des intégrines à sous-unité $\beta 1$ (Bouvard et al., 2007; Bouvard et al., 2003). La caractérisation de son mode d'action et de son rôle dans le développement osseux constitue une partie des objectifs de cette thèse.

En plus de leur priming et de leur activation, l'interaction des intégrines avec les molécules de la MEC induit leur regroupement en unités appelées structures d'adhérence. Ce « clustering » des intégrines est associé au recrutement de molécules permettant l'ancrage au cytosquelette d'actine, de protéines de signalisation et de molécules adaptatrices (Hynes, 2002). L'assemblage des intégrines et de leurs interacteurs en complexes supramoléculaires constitue une boucle d'amplification de la signalisation « entrante » et permet la régulation fine de l'adhérence ainsi que de la prolifération, de la survie et de la différenciation cellulaire.

Différents types d'adhérences reliant la cellule à la matrice extracellulaire ont été décrits. Ces structures qui ont pour caractéristique d'être couplées au cytosquelette d'actine, se distinguent par leur localisation cellulaire, leur composition, l'orientation de l'actine qui leur est associée et leur fonction. On compte six principaux types de structures d'adhérence : les complexes focaux, les adhérences précoces, les adhérences focales, les adhérences fibrillaires, les podosomes et les invadosomes (Block et al., 2008).

Les complexes focaux et adhérences précoces sont de petites structures ponctiformes ($0,25\mu\text{m}^2$ pour les complexes focaux (Nobes and Hall, 1995) et $0,1\mu\text{m}^2$ pour les adhérences précoces (Choi et al., 2008)) composées principalement d'intégrines $\alpha5\beta1$ et $\alpha\text{v}\beta3$ (Ballestrem et al., 2001). Alors que les complexes focaux sont induits par l'activation constitutive de la protéine G Rac1 (Nobes and Hall, 1995), les adhérences précoces sont des structures physiologiques dynamiques qui disparaissent rapidement ou évoluent en adhérences focales (Figure I.4).

Les adhérences focales sont des structures adhésives de 1 à $5\mu\text{m}^2$ situées à l'extrémité des fibres de stress. Elles sont elles aussi composées d'intégrines $\alpha5\beta1$ et $\alpha\text{v}\beta3$ mais à des densités plus importantes que dans les adhérences précoces (Ballestrem et al., 2001). Ces structures sont plus stables que les adhérences précoces avec une durée de vie pouvant aller jusqu'à 90 minutes et peuvent évoluer en un troisième type d'adhérence, les adhérences fibrillaires (Figure I.4).

Les adhérences fibrillaires sont pour leur part d'aspect allongé, plus fines que les adhérences focales et localisées en position plus centrale dans la cellule. Elles sont composées d'intégrines $\alpha5\beta1$ liées à la fibronectine et dont le niveau d'activation ou de

« priming » est supérieur à celui observé dans les adhérences focales (Clark et al., 2005). Les adhérences fibrillaires sont le résultat du déplacement des intégrines $\alpha5\beta1$ assuré par la contractilité des filaments d'actine (Pankov et al., 2000). La tensine, la protéine structurale remplaçant la taline dans les adhérences fibrillaires, joue un rôle prépondérant dans la translocation des intégrines au niveau des adhérences fibrillaires (Pankov et al., 2000) (Figure I.4).

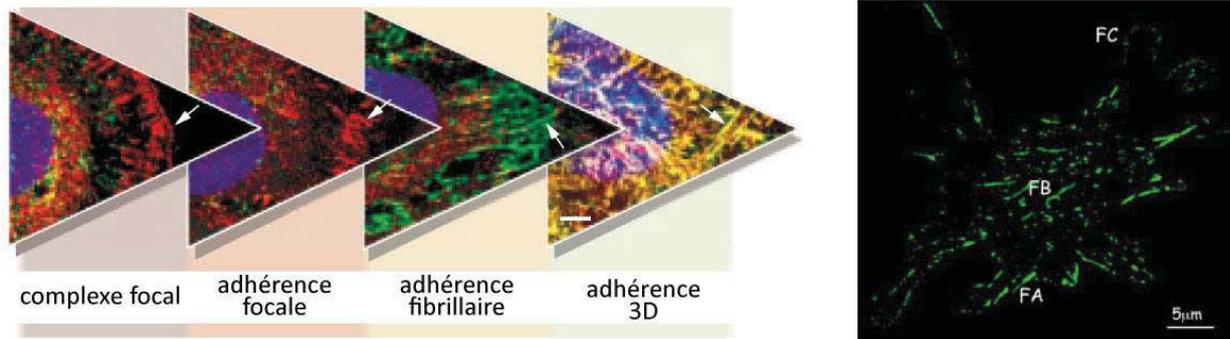


Figure I.4 : Les différentes structures d'adhérence. Les différentes structures d'adhérences observables chez les cellules en cultures en 2D ou 3D sont visualisées par immunofluorescence (FC: complexe focal; FA: adhérence focale; FB: adhérence fibrillaire)(d'après (Cukierman et al., 2002; Worth and Parsons, 2008)).

I.4.2. L'organisation et le remodelage de la matrice

Les intégrines sont des acteurs majeurs de l'assemblage et de l'organisation active de la MEC par les cellules. En effet, la translocation des intégrines $\alpha5\beta1$ liées à la fibronectine (FN) le long des adhérences fibrillaires induit l'étirement de la fibronectine, démasquant des sites cryptiques d'auto-assemblage et permettant ainsi la formation de fibres de fibronectine formant une matrice insoluble (Figure I.5). L'assemblage de la matrice de fibronectine est donc dépendant de l'interaction FN/intégrine mais aussi du cytosquelette et de la contractilité cellulaire à l'origine de la translocation des intégrines le long des adhérences fibrillaires (Zhong et al., 1998). Le changement conformationnel des molécules de fibronectine suite à l'interaction avec les intégrines dévoile en plus des sites d'auto-assemblage des sites de liaison à d'autres molécules de la MEC telles que les collagènes (Engvall et al., 1978). Cette interaction entre la fibronectine et le collagène est un élément important pour l'assemblage des fibres de collagène, les intégrines jouant ainsi indirectement un rôle dans l'assemblage de la matrice de collagène (McDonald et al., 1982). Toutefois, la réciproque semble aussi vraie puisque des fibroblastes

dépourvus de collagène de type I (Col1A1^{-/-}) présentent une matrice de fibronectine peu dense (Dzamba et al., 1993).

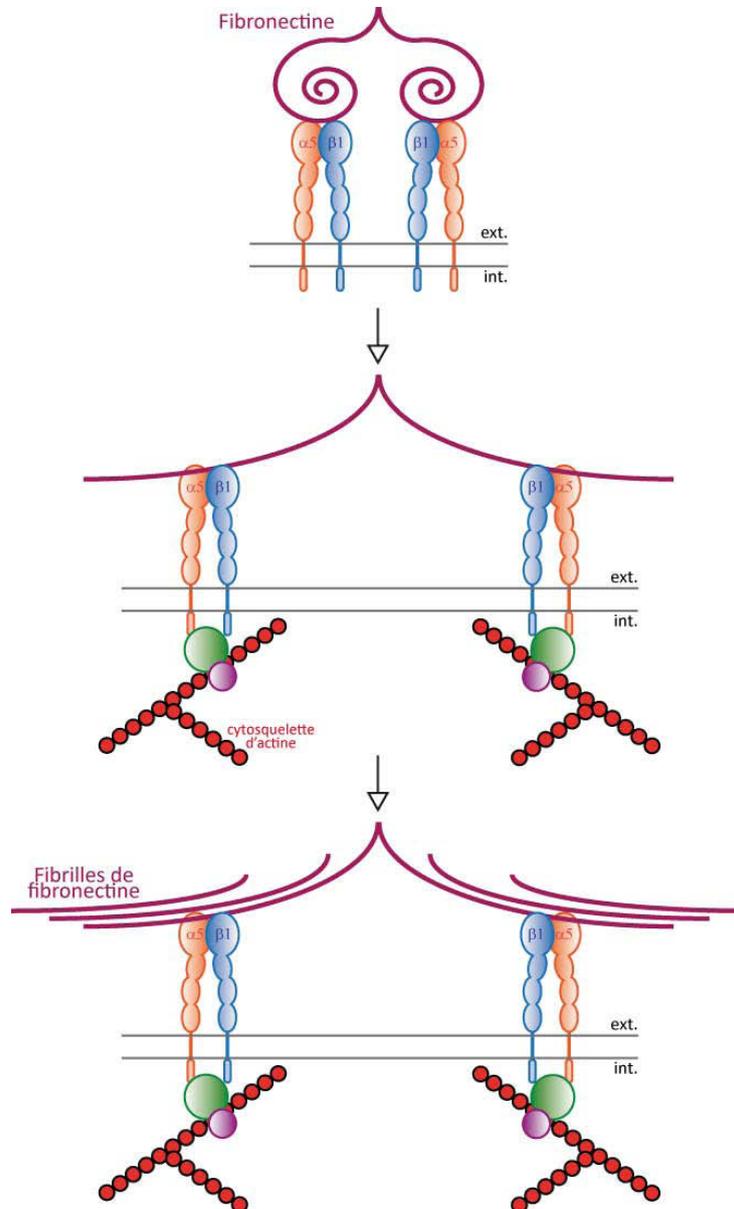


Figure I.5 : Les différentes étapes de l'organisation de la matrice de fibronectine. La fibronectine sous sa forme repliée lie les intégrines $\alpha_5\beta_1$. La liaison de la fibronectine sur les intégrines induit une réorganisation du cytosquelette d'actine et active des complexes de signalisation intracellulaire (cercles verts et violets). La contractilité cellulaire permet le dépliement conformationnel des molécules de fibronectine liées aux intégrines, démasquant des sites d'auto-assemblage. Les fibrilles de fibronectine résultent de l'assemblage de plusieurs molécules de fibronectine entre elles (d'après (Mao and Schwarzbauer, 2005)).

I.4.3. La prolifération cellulaire

L'interaction de la cellule avec la MEC, via les intégrines, est reconnue depuis longtemps comme étant un facteur déterminant de la croissance cellulaire. En effet, la rupture de cette liaison conduit chez les cellules non-transformées à un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Stoker et al., 1968). La croissance cellulaire est donc un phénomène dépendant de l'ancrage à la matrice, on parle d'« anchorage-dependent cell growth ». La perte de cette dépendance, du fait d'une modification de la fonction des intégrines par exemple, contribue à la croissance tumorale. Ainsi, la nature de la MEC ainsi que ses propriétés chimiques et physiques contrôlent les capacités prolifératives des cellules. Comment précisément les intégrines régulent la prolifération cellulaire est toujours sujet à débat et de nombreuses voies de signalisation semblent être impliquées (Giancotti and Ruoslahti, 1999). Toutefois, il apparaît clairement que les intégrines à chaîne $\beta 1$, et plus particulièrement $\alpha 5\beta 1$, favorisent la prolifération, ceci expliquant pourquoi la fibronectine (substrat majeur de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$) est pro-proliférative. Concernant les voies de signalisation impliquées en aval des intégrines, beaucoup de travail reste à faire mais il semble que les intégrines pourraient réguler la prolifération cellulaire en coopération avec les facteurs de croissance via de nombreuses voies de signalisation parmi lesquelles les voies AKT, MAPK/ERK, JNK menant d'une part à la répression des inhibiteurs des cyclin-dépendent kinases (CDKs) comme $p21^{cip1}$ et $p27^{kip1}$ et d'autre part à l'expression de la cycline D1 (Schwartz and Assoian, 2001) (Figure I.6).

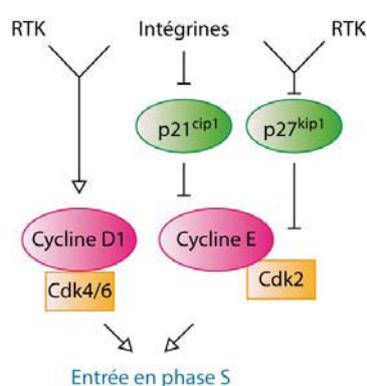


Figure I.6 : Régulation de l'entrée en phase S par les intégrines et les récepteurs à activité tyrosine kinase. Cette figure présente le dialogue entre les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) et intégrines. L'activation des voies Rac et ERK permettent l'induction de la cycline D1 en milieu de phase G1. La signalisation intégrine réprime alors l'expression de $p21^{cip1}$ permettant ainsi l'activation du complexe cycline E/Cdk2. La signalisation jointe des intégrines et RTK conduit aussi à la répression de $p27^{kip1}$ en fin de phase G1 permettant elle aussi l'activation du complexe cycline E/Cdk2 et l'entrée en phase S (d'après (Schwartz and Assoian, 2001)).

Les intégrines n'ayant pas d'activité kinase intrinsèque, elles recrutent des protéines de signalisation au niveau des adhérences focales, ces dernières activant ou modulant les voies de signalisation en aval. Ainsi, l'engagement des intégrines induit le recrutement et la phosphorylation de la protéine kinase FAK qui forme une plateforme pour le recrutement d'autres protéines contrôlant des protéines de transduction clés ou des médiateurs de l'activation des voies de signalisation MAPK/ERK et JNK, les kinases de la famille Src et les GTPases monomériques. Parmi d'autres, FAK interagit avec les adaptateurs Shc, growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2) et le facteur d'échange son of sevenless (Sos), conduisant au final à l'activation de Ras et de la voie MAPK ERK (Schlaepfer and Hunter, 1998). De plus, il a été montré que la protéine FAK contrôlait indirectement la signalisation dépendante des récepteurs aux facteurs de croissance via son interaction avec les protéines de la famille ERM (ezrin/radixin/moesin) et le Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor (NHERF) formant ainsi un lien entre récepteurs aux facteurs de croissance de type PDGFR ou EGFR et signalisation intégrine (James et al., 2004; Sieg et al., 2000). Dans la même idée, il a été montré que FAK interagissait avec l'EGFR via la protéine SRC-3Delta4 coordonnant ainsi la migration cellulaire dépendante de l'EGF (Long et al., 2010). Enfin, suite à l'activation des intégrines, les GTPases monomériques Rac1 et Cdc42 sont recrutées à la membrane conduisant à l'activation des p21 activated kinases (PAKs) et de la c-Jun N-terminal kinase (JNK) en aval.

I.4.4. La survie cellulaire

La survie cellulaire est, elle aussi, dépendante de l'adhésion cellulaire à la MEC. En effet, les cellules qui perdent contact avec la MEC meurent par un phénomène d'apoptose aussi appelée anoïkis (Frisch, 1997). La perte d'engagement des intégrines induit la voie extrinsèque de l'apoptose via des ligands extracellulaires tels que Fas ou le TNF α entraînant le regroupement des récepteurs de mort Fas (Stupack and Chersesh, 2002). En outre, des travaux ont montré que les intégrines $\alpha\beta3$ non occupées par un ligand induisaient l'apoptose de manière dépendante de la caspase 8 (Zhao et al., 2005). Les intégrines participent à la résistance aux stimuli pro-apoptotiques en activant la voie intrinsèque de mort cellulaire, ou voie mitochondriale. En effet, via l'activation de voies de signalisation telles que la voie Pi3K/AKT FAK-dépendante, les intégrines régulent l'expression et l'activité des protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl2 (Zhang et al., 1995). En parallèle de ce mécanisme, les intégrines régulent négativement la mort

induite par les protéines pro-apoptotiques telles que Bad via l'activation de la voie des Raf/MEK/ERK (Chiarugi and Giannoni, 2008; Khwaja et al., 1997; Stupack and Cheresch, 2002).

I.4.5. La différenciation cellulaire

La différenciation cellulaire est le processus par lequel les cellules totipotentes issues de la cellule-œuf deviennent des cellules spécialisées de l'organisme. Au cours de cette différenciation, les cellules subissent des changements morphologiques et physiologiques dictés par une programmation spatio-temporelle de l'expression de son génome. Les propriétés physico-chimiques de la matrice sont des facteurs importants dans le processus de différenciation des cellules souches. En effet, le niveau de rigidité de la MEC peut engager des cellules souches mésenchymateuses vers différents types cellulaires (neuronale, musculaire, adipocytaire ou ostéoblastique)(Engler et al., 2006). L'adhérence dépendante des intégrines et plus particulièrement les interactions de certaines intégrines avec des composants de la MEC spécifiques semblent requises pour l'induction de la différenciation cellulaire (Damsky, 1999). Par exemple, la synergie entre la signalisation dépendante de la bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) et celle induite par l'interaction entre les intégrines à chaîne $\beta 1$ et le collagène est nécessaire à la différenciation ostéoblastique (Jikko et al., 1999).

II. LA PROTEINE ICAP-1 α : REGULATEUR DE L'INTEGRINE $\beta 1$

Malgré leurs similarités de séquences, les sous-unités β des intégrines ont chacune une localisation propre au niveau des contacts focaux (Wayner et al., 1991), et induisent différemment l'expression génique (Yurochko et al., 1992) et la phosphorylation de protéines cytoplasmiques en réponse à leur « clustering » (Freedman et al., 1993). Ces différences mettent en évidence l'existence de régulateurs et d'interacteurs propres à chaque sous-unité et participant à leurs spécificités.

Parmi les régulateurs spécifiques de la sous-unité $\beta 1$ des intégrines, la protéine ICAP-1 α , qui nous intéresse tout particulièrement, s'est avérée être un régulateur de la dynamique des adhésions focales impliqué dans la perception du micro-

environnement cellulaire (Millon-Fremillon et al., 2008). ICAP-1 α a été identifiée en 1997 lors d'un crible double hybride chez la levure visant à caractériser les interacteurs de la sous-unité β 1A des intégrines (Chang et al., 1997). De plus, ICAP-1 a été la première démonstration de l'importance de la régulation négative des intégrines non seulement dans la dynamique des structures adhésives mais aussi pour le développement normal en général.

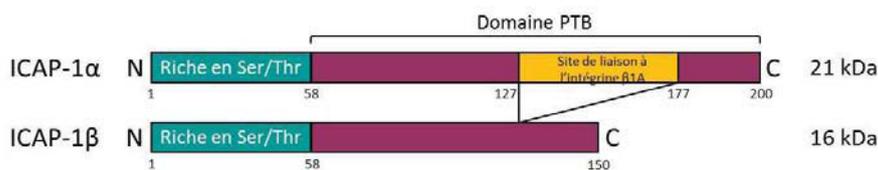
II.1. Structure de la protéine ICAP-1 α

ICAP-1 α est une petite protéine de 200 acides aminés et de 21KDa de masse moléculaire, qui ne présente aucune homologie avec des protéines connues. Chez l'homme, ICAP-1 est transcrit en deux ARNs messagers suite à un épissage alternatif de l'exon 6 produisant ainsi deux isoformes : ICAP-1 α (la forme longue de 200 aa) et ICAP-1 β (la forme courte de 150 aa) (Chang et al., 1997)(Figure II.1A). La structure de la protéine ICAP-1 α se divise en deux grandes régions. La région N-terminale (aa 1-60) est riche en sérines (Ser) et thréonines (Thr) et présente de nombreux sites consensus de phosphorylation par des kinases telles que les protéines kinases C (PKC) et A (PKA) ou encore la Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CamKII)(Bouvard et al., 2006). La région C-terminale (aa 61-200) est, pour sa part, composée d'un domaine PTB contenant le site d'interaction avec le domaine NPKY cytoplasmique de l'intégrine β 1A (Zhang and Hemler, 1999). L'isoforme ICAP-1 β est réduite de 50 aa (aa 127-177) par rapport à la forme α et n'interagit pas l'intégrine β 1A (Figure II.1A). Il est à noter que l'isoforme ICAP-1 β n'est pas exprimée dans tous les types cellulaires chez l'homme contrairement à ICAP-1 α , et a été mise en évidence uniquement dans des lignées de cellules cancéreuses humaines. L'absence de séquence EST correspondante ainsi que la présence d'une seule bande en northern-blot laisse supposer l'absence d'ICAP-1 β chez la souris (Bouvard, communication personnelle).

L'interaction de la protéine ICAP-1 α avec l'intégrine β 1 engage des résidus spécifiques sur l'un et l'autre des interacteurs. Au niveau de l'intégrine β 1, les 13 derniers acides aminés du domaine cytoplasmique (aa 786-798), contenant le domaine NPKY distal, sont nécessaires à l'interaction avec ICAP-1 α (Figure I.3 et II.1B). Toutefois, bien que nécessaires, les quatre acides aminés du NPKY distal de l'intégrine β 1 ne sont pas

suffisants à l'interaction avec ICAP-1 α . Des expériences de mutagenèse dirigée sur différents résidus du domaine cytoplasmique de l'intégrine β 1A ont permis d'identifier deux autres résidus indispensables à l'interaction ICAP-1 α / β 1A, les valines 787 et 790 (Chang et al., 2002). Ceci explique que les sous-unités β 2 et β 3, présentant des thréonines et non des valines en position homologues des résidus 787 et 790, n'interagissent pas avec la protéine ICAP-1 α . De même, l'intégrine β 1D qui présente à ces positions respectivement une isoleucine et une phénylalanine, n'interagit pas avec ICAP-1 α . Enfin, la mutation des résidus homologues de 787 et 790 des sous-unités β 2 et β 1D en valines promeut leur interaction avec ICAP-1 α confirmant l'importance de ces derniers pour l'interaction entre ICAP-1 α et intégrine β (Chang et al., 2002)(Figure II.1B).

A.



B.

		Interaction avec ICAP-1 α
TM-HDRREFAKFEKEKMNAKWDTGENPIYKSAVTTVVNPKYEGK	β 1A	+++
TM-HDRREFAKFEKEKMNAKWDTQENPIYKSPINNFKNPNYGRKAGL	β 1D	-
TM-HDRREFAKFEKEKMNAKWDTQENPIYKSAVTTVVNPKYGRKAGL	β 1A/D	+++
TM-SDLREYRRFEKEKLSQWNNNDNPLFKSATTTVVNPKFAES	β 2	-
TM-SDLREYRRFEKEKLSQWNNNDNPLFKSAVTTVMNPKFAES	β 2 T758V	+++
TM-HDRKEFAKFEERARAKWDTANNPLYKEASTFTNITYRGT	β 3	-

Figure II.1 : Régulation de l'entrée en phase S par les intégrines et les récepteurs à activité tyrosine kinase. A. Structure des deux isoformes de la protéine ICAP-1. B. Séquences et mutations sur les domaines cytoplasmiques des intégrines β 1, β 2 et β 3 favorisant l'interaction avec ICAP-1 α (d'après (Chang et al., 2002)).

Concernant les résidus d'ICAP-1 α participant à la spécificité de liaison avec l'intégrine β 1A, il a pu être montré que seule une partie du domaine PTB d'ICAP-1 α était nécessaire à cette liaison. En effet, la partie C-terminale d'ICAP-1 α (aa 100-200) seule est suffisante (Bouvard et al., 2003). Certains résidus de cette partie C-terminale présentent des fonctions structurales particulières dans l'interaction avec l'intégrine β 1A. Ainsi, la leucine 135 et l'isoleucine 138 forment des liaisons hydrogène avec l'asparagine (N) 792

du NPKY de l'intégrine, l'isoleucine 139 établit une interaction hydrophobe avec la tyrosine (Y) du NPKY et les résidus L187, S188 et M141 et C184 forment une poche hydrophobe à proximité de la valine 787 de l'intégrine β 1A (Chang et al., 2002; Liu et al., 2013).

II.2. Régulation de la fonction d'ICAP-1 α , importance de la phosphorylation

Comme vu précédemment, la protéine ICAP-1 α est composée d'une partie N-terminale riche en sérines et thréonines, présentant de nombreux sites consensus de phosphorylation par différentes kinases. Entre autres, on pourra citer trois sérines comprises dans des sites consensus de phosphorylation par la PKC en position 20, 46 et 197 et une semblant être reconnue par la PKA en position 10. Concernant la phosphorylation sur les thréonines, un site de phosphorylation par la CaMKII a été identifié en position 38 (Bouvard and Block, 1998). La phosphorylation d'ICAP-1 α est stimulée par l'adhérence des cellules sur fibronectine (Chang et al., 1997; Zhang and Hemler, 1999). Un travail mené récemment au laboratoire a mis en évidence le rôle régulateur de la phosphorylation d'ICAP-1 α sur sa thréonine 38 par la CaMKII (Millon-Fremillon et al., en soumission). En effet, certaines données structurales et d'interaction *in vitro* entre les parties N- et C- terminales d'ICAP-1 suggèrent que la protéine ICAP-1 α présenterait deux états conformationnels distincts. Ainsi, par un repliement intramoléculaire de la partie N-terminale sur la partie C-terminale, ICAP-1 α masquerait son domaine PTB inhibant ainsi son interaction avec l'intégrine β 1 et restreignant par là même son action inhibitrice sur l'assemblage des adhérences focales. L'interaction avec l'intégrine β 1 nécessite donc le dépliement d'ICAP-1 α et sa transition vers un état conformationnel actif. Cette « ouverture » semble être dépendante de la phosphorylation d'ICAP-1 α en position 38 par la CaMKII (Millon-Fremillon et al., en soumission). La CaMKII serait activée par l'intégrine α 5 β 1 (Blystone et al., 1999) et stimulerait la dynamique des adhérences focales (Easley et al., 2008) ainsi que la migration cellulaire (Bilato et al., 1997) en générant une boucle de rétroaction sur l'intégrine β 1 via l'activation d'ICAP-1 α (Millon-Fremillon et al., en soumission).

D'autres modifications post-traductionnelles ont été rapportées pour ICAP-1 α comme la mono et la poly-ubiquitination. Toutefois, leurs implications dans la régulation de la fonction d'ICAP-1 α ne sont pas encore élucidées.

De plus, il est intéressant de noter que la régulation des différentes fonctions d'ICAP-1 α est également dépendante de ses interacteurs protéiques et de la localisation subcellulaire des différents complexes formés (cf. Partie II.4).

II.3. La perte d'ICAP-1 α *in vivo* : un phénotype osseux

L'inactivation génique de la protéine ICAP-1 α chez la souris a été réalisée en 2007 (Bouvard et al., 2007). Les souris délétées pour ICAP-1 α présentent principalement un phénotype osseux caractérisé par un défaut de croissance et un sévère dysmorphisme cranio-facial. La perte d'ICAP-1 α conduit à une réduction du nombre d'ostéoblastes au niveau du front ostéogénique, cette réduction étant elle-même due à deux phénomènes indépendants : d'une part un défaut de prolifération des pré-ostéoblastes et d'autre part un défaut de compaction et de différenciation précoce des cellules souches mésenchymateuses (Bouvard et al., 2007).

La protéine ICAP-1 α semble aussi impliquée dans la régulation de l'angiogenèse (Brutsch et al., 2010). En effet, la perte d'ICAP-1 α dans des cultures primaires de cellules endothéliales humaines favorise le développement d'un réseau vasculaire fortement branché *in vitro* et *in vivo* après leur xénogreffe chez la souris (Brutsch et al., 2010). Cependant les souris déficientes pour ICAP-1 α ne présentent pas de défauts majeurs du système vasculaire au cours de l'embryogenèse ou chez l'adulte.

II.4. Fonctions de la protéine ICAP-1 α

II.4.1. ICAP-1 α , régulateur négatif de l'adhérence cellulaire et rôle dans la perception de l'environnement cellulaire

L'étude de cellules dépourvues d'ICAP-1 α a pu mettre en évidence le rôle de cette protéine dans la régulation de l'adhérence cellulaire. En effet, la perte d'ICAP-1 augmente l'adhérence des cellules sur collagène de type I, un ligand spécifique des

intégrines à chaîne $\beta 1$ (Bouvard et al., 2007) et diminue en parallèle la migration cellulaire sur laminine (Alvarez et al., 2008). A contrario, la surexpression d'ICAP-1 α réduit l'étalement et induit une augmentation de la migration cellulaire sur des matrices spécifiques de l'intégrine $\beta 1$ telles que la fibronectine ou la laminine (Alvarez et al., 2008; Bouvard et al., 2003; Zhang and Hemler, 1999). Cette augmentation de la migration cellulaire est la conséquence de l'absence de formation d'adhérences focales lors de la surexpression d'ICAP-1 α et de la déstabilisation des adhérences à intégrines $\beta 1$ déjà formées (Bouvard et al., 2003). En effet, ICAP-1 α en se fixant sur le domaine cytoplasmique de l'intégrine $\beta 1$ entre en compétition avec la taline (Bouvard et al., 2003). Cette compétition peut s'expliquer par deux mécanismes : soit un encombrement stérique, les deux NPxY fixant la taline et ICAP-1 α étant relativement proches, soit par un changement conformationnel suite à la fixation d'un des deux partenaires masquant le site de fixation du second. Dans tous les cas, la fixation d'ICAP-1 α sur l'intégrine $\beta 1$ maintient cette dernière dans un état inactif, de faible affinité pour son ligand (Bouvard et al., 2007). ICAP-1 α en entrant en compétition avec la taline jouerait ainsi un rôle inhibiteur sur l'activation des intégrines $\beta 1$, phénomène nécessaire à la dynamique des adhérences, à l'étalement et la migration cellulaire. L'absence d'ICAP-1 α accélère donc l'assemblage des adhérences focales sans toutefois modifier leur désassemblage (Millon-Fremillon et al., 2008). L'effet de la perte d'ICAP-1 α sur la dynamique des adhérences focales serait le résultat du maintien des intégrines dans un état activé, de haute affinité pour le substrat. Effectivement, l'expression d'un mutant de pré-activation de l'intégrine $\beta 1$ (mutation D759A rompant le pont salin entre les sous-unités α et β) reproduit le phénotype des cellules dépourvues d'ICAP-1 α (Millon-Fremillon et al., 2008). Ainsi, ICAP-1 α réduit l'affinité de l'intégrine $\beta 1$ pour ses ligands, phénomène nécessaire au contrôle de la dynamique de l'assemblage des adhérences focales. Finalement, de par cette implication dans la régulation de la dynamique des adhérences focales, ICAP-1 α contrôle la perception cellulaire de la densité de surface de la matrice extracellulaire. En effet, les cellules dépourvues d'ICAP-1 α sur de faibles densités de matrice présentent un comportement similaire à celui des cellules sauvages lorsqu'elles sont placées sur des densités de matrice plus importantes (Millon-Fremillon et al., 2008). La perte d'ICAP-1 α diminue donc la capacité des cellules à percevoir des matrices de faible densité, ceci résultant en une incapacité à adapter leur comportement adhésif et migratoire aux variations physiologiques de densité de la MEC.

II.4.2. ICAP-1 α , régulateur de la prolifération cellulaire

Lors des étapes précoces de l'étalement, la protéine ICAP-1 se localise avec l'intégrine $\beta 1$ en périphérie cellulaire au niveau du lamellipode (Fournier et al., 2002). Toutefois, une fois les premières étapes de l'étalement passées, ICAP-1 α adopte une double localisation à la fois cytoplasmique et nucléaire (Bouvard et al., 2003; Fournier et al., 2002). La régulation de la translocation nucléaire d'ICAP-1 α dépend de l'adhérence cellulaire et de son interaction avec l'intégrine $\beta 1$. Ainsi, lorsque l'intégrine $\beta 1$ est engagée sur son ligand, l'interaction avec la protéine ICAP-1 α est abolie et cette dernière serait transloquée dans le noyau. Une fois dans le noyau, ICAP-1 α stimule l'activité transcriptionnelle du promoteur du proto-oncogène *c-myc* et par là même la prolifération cellulaire (Fournier et al., 2002), probablement via son interaction avec la protéine Nm23-H2 (Fournier et al., 2002; Fournier et al., 2005; Postel et al., 1993). L'étalement cellulaire sur des ligands de l'intégrine $\beta 1$ favorise donc la localisation nucléaire d'ICAP-1 α associée à une augmentation de l'activité du gène *c-myc* et de la cycline D1, une cible de la protéine *c-myc* responsable de la progression du cycle cellulaire (Fournier et al., 2005).

II.4.3. Autres interacteurs protéiques et fonctions associées

La protéine ICAP-1 α , en plus de son rôle régulateur de l'adhérence et la migration cellulaire via son action sur l'intégrine $\beta 1$, et de la prolifération cellulaire via la régulation de Nm23, semble contrôler de nombreuses autres protéines et signalisations dans la cellule.

ICAP-1 α interagit avec la protéine Krit-1 (K-rev interaction trapped-1), les interactions avec l'intégrine $\beta 1$ ou Krit-1 étant mutuellement exclusives (Zhang et al., 2001). Il a été montré très récemment que Krit-1 inhibait l'action négative d'ICAP-1 α sur l'intégrine $\beta 1$ en séquestrant ICAP-1 α (Liu et al., 2013). Krit-1 serait donc un compétiteur de l'intégrine $\beta 1$ vis-à-vis d'ICAP-1 α . La mutation de la protéine Krit-1 est impliquée dans une pathologie vasculaire cérébrale congénitale : CCM (Cerebral Cavernous Malformation) d'où le deuxième nom de Krit-1, CCM1. L'interaction entre ICAP-1 α et Krit-1 induit l'activation de Krit-1 et son changement conformationnel autorisant son interaction avec d'autres partenaires et sa localisation à la membrane (Beraud-Dufour et

al., 2007). De plus, il semblerait que l'interaction avec la protéine ICAP-1 α permette la translocation nucléaire de Krit-1, translocation bloquée par le recrutement d'une troisième protéine, CCM2, dans le complexe (Zawistowski et al., 2005), soulignant la complexité de localisation et de composition des différents complexes protéiques dépendants d'ICAP-1 α .

Une interaction a été mise en évidence entre la protéine ICAP-1 α et les protéines G Rac1 et Cdc42 (Degani et al., 2002). ICAP-1 α dans ces complexes aurait la fonction d'un Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor (GDI) empêchant l'activation de Rac1 et Cdc42. De plus, ICAP-1 α semble bloquer le recrutement de Cdc42 à la membrane. Toutefois, le rôle fonctionnel de ces interactions n'a pas été établi et les résultats, n'ayant pas été reproduits par d'autres laboratoires, sont actuellement controversés. De plus, la structure récemment caractérisée d'ICAP-1 α ne confirme pas ces résultats puisqu'ICAP-1 α ne présente pas une structure d'immunoglobuline commune à tous les GDI mais plutôt une structure de type PTB (Liu et al., 2013).

ICAP-1 α bien que n'interagissant pas avec la protéine G RhoA, semble toutefois interagir avec son effecteur ROCK (Alvarez et al., 2008). Le complexe formé par ces deux protéines se localise avec l'intégrine β 1 en bordure membranaire, au niveau des « ruffles » et de la queue de rétraction. De plus, l'inhibition de ROCK mime la perte d'ICAP-1 α avec une réduction de la motilité cellulaire et une diminution du nombre des adhérences focales suggérant un rôle positif d'ICAP-1 α dans le recrutement de ROCK à la membrane et dans la localisation de son activité à proximité de l'intégrine β 1 (Alvarez et al., 2008).

III. LE TISSU OSSEUX :

Le squelette est un tissu qui a énormément évolué depuis sa forme externe primitive ayant pour rôle de protéger les organes des organismes inférieurs et leur permettre de supporter les forces extérieures telles la gravité. Chez les vertébrés supérieurs, le squelette est devenu un organe interne complexe composé de plus de 200 pièces chez l'homme, chacune ayant une taille, une forme et une localisation spécifique : les os. Il est maintenant reconnu que le squelette n'assure plus seulement une fonction de protection mécanique mais prend part à d'importantes fonctions physiologiques aussi diverses que

le maintien d'une niche pour le renouvellement des cellules sanguines ou la régulation hormonale nécessaire au contrôle du métabolisme du glucose, au stockage des graisses et à la fertilité (Karsenty, 2011).

III.1. Mise en place du tissu osseux : ossification endochondrale versus intramembraneuse

La mise en place du tissu osseux chez l'embryon humain commence entre 40 et 50 jours post-fécondation et à 12 jours et demi (E12.5) chez la souris. Chez les mammifères, les os proviennent de différentes lignées embryonnaires : le squelette craniofacial est principalement formé par les cellules dérivées des crêtes neurales alors que le squelette axial provient du mésoderme paraxial et le squelette des membres est formé par les cellules mésodermiques provenant des plaques latérales (Olsen et al., 2000).

Après une première phase de migration, les cellules mésenchymateuses se condensent et se différencient soit en ostéoblastes, en ce qui concerne l'ossification intramembraneuse, soit en chondrocytes pour ce qui est de l'ossification endochondrale. Alors que la majorité des os du squelette se forment par ossification endochondrale, certains os comme la calvaire ou encore les clavicules se développent par ossification intramembraneuse.

La séquence morphogénétique de l'ossification endochondrale est initiée par l'engagement des cellules mésenchymateuses en réponse à des morphogènes solubles tels que les ligands des familles Hedgehog, WNT, et FGF et peut-être divisée en 5 étapes consécutives (DeLise et al., 2000; Karsenty et al., 2009; Olsen et al., 2000). Commence alors une phase de condensation et de différenciation. Cette deuxième phase correspond à l'agrégation des cellules mésenchymateuses impliquant à la fois les protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine et les molécules d'adhérence intercellulaires telles que les cadhérines. Cette phase est aussi caractérisée par l'expression de marqueurs chondrocytaires tels que le collagène de type II. Après cette deuxième étape, les chondrocytes commencent à proliférer abondamment et déposent une matrice cartilagineuse typique contenant des fibres de collagène, des protéoglycanes, des hyaluronanes et des glycoprotéines non collagéniques. Dans la quatrième phase, les chondrocytes situés dans la région centrale non-vascularisée

arrêtent de se diviser et voient leur volume augmenter pour devenir des chondrocytes hypertrophiques exprimant du collagène de type X et du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), un facteur angiogénique. Les chondrocytes hypertrophiques subissent ensuite la dernière phase de leur différenciation caractérisée par la baisse d'expression du collagène de type X et l'augmentation de l'expression de la matrix métalloprotéinase 13 (MMP13), de la phosphatase alcaline (ALP) et de l'ostéopontine (OPN) conduisant à la minéralisation de la matrice cartilagineuse. Pour finir, les chondrocytes hypertrophiques pris dans leur matrice minéralisée vont mourir par apoptose. Au moment de l'initiation de l'hypertrophie chondrocytaire, les cellules mésenchymateuses péri-chondriales se trouvant de part et d'autre du corps hypertrophique se différencient en ostéoblastes par ossification intramembraneuse afin de former le périoste. Au cours de la dernière étape, les vaisseaux sanguins attirés par le VEGF produit par les chondrocytes hypertrophiques, envahissent le corps hypertrophique afin d'initier la formation du centre d'ossification primaire. L'invasion vasculaire permet le recrutement d'une part de monocytes et macrophages qui vont se différencier en ostéoclastes ayant la capacité de résorber la matrice extracellulaire entourant les chondrocytes hypertrophiques, et d'autre part d'ostéoblastes qui vont déposer de l'os trabéculaire sur la matrice cartilagineuse restante. A la surface des épiphyses, le cartilage n'est pas remplacé par de l'os, reste intact et persiste pour former le cartilage articulaire tout au long de la vie (Kronenberg, 2003; Olsen et al., 2000).

III.2. Croissance, modelage et remodelage osseux

La formation osseuse reflète différents processus dépendants de l'âge et de la localisation à l'intérieur d'un élément osseux qui peuvent être catégorisés en croissance osseuse, modelage osseux et remodelage osseux.

III.2.1. Croissance osseuse

La croissance osseuse chez l'homme commence au cours de l'embryogénèse et continue durant l'enfance et l'adolescence. La croissance longitudinale s'effectue au niveau des plaques de croissance où les chondrocytes prolifèrent. Le processus de formation du tissu osseux conduit à la mise en place d'une architecture osseuse spécifique des os

longs apparente au niveau histologique où les chondrocytes sont uniquement présents au niveau des régions métaphysaires, sites où ils subissent des changements morphologiques conduisant au final à la formation de colonnes (Figure III.1). Ces colonnes vont ensuite servir de modèle et de support à l'os trabéculaire au niveau de la région épiphysaire. La jonction entre la plaque de croissance formée par les chondrocytes et l'os trabéculaire forme une frontière nette où une forte densité de vaisseaux sanguins est observée en proche contact des ostéoblastes. Ainsi, la formation du tissu osseux met en jeu quatre acteurs majeurs que sont les chondrocytes, les ostéoblastes, les ostéoclastes et les cellules endothéliales. Ces quatre acteurs ne doivent pas seulement être couplés temporellement mais aussi spatialement afin d'aboutir à la formation d'un tissu osseux structuré.

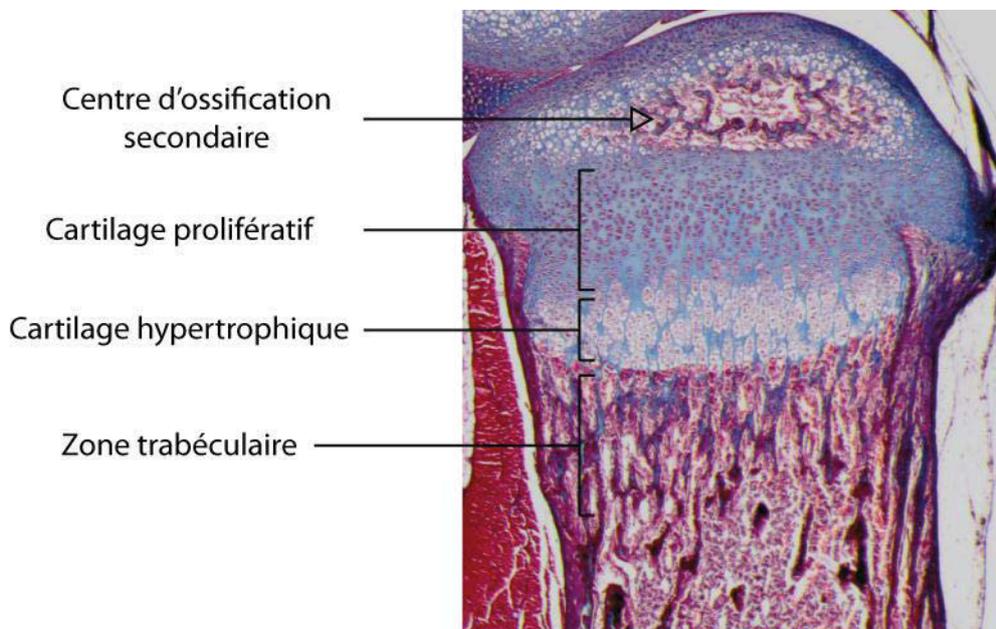


Figure III.1 : La structure des os longs est le reflet du processus d'ossification endochondrale. La structure caractéristique des os longs peut être observée sur coupe histologique après coloration au Trichrome de Masson par exemple. Le centre d'ossification secondaire peut être observé en région épiphysaire. Le processus d'ossification endochondrale basé sur la prolifération puis l'hypertrophie des chondrocytes est facilement visualisable. La zone de cartilage prolifératif contient des chondrocytes de petite taille, alors que la zone de cartilage hypertrophique de couleur plus claire présente des chondrocytes beaucoup plus volumineux. Enfin, la zone trabéculaire est formée de travées osseuses et contient de nombreux vaisseaux sanguins.

Alors que le dialogue entre les chondrocytes, les ostéoblastes, les ostéoclastes et les cellules endothéliales est critique pour la mise en place et la croissance du tissu osseux ce couplage reste indispensable à la régulation de l'homéostasie osseuse plus tard chez l'adulte. En effet, la particularité du tissu osseux tient dans le fait qu'un type cellulaire, les ostéoclastes, a pour fonction principale sa destruction. Cette destruction est très

finement contrôlée et va jouer un rôle important dans le modelage osseux qui a lieu tout au long de la vie, et dans le remodelage osseux à l'âge adulte. Ainsi, un fin dialogue entre les quatre acteurs de l'ostéogenèse est nécessaire tout au long de la vie.

III.2.2. Modelage osseux

Le modelage osseux est le processus par lequel les os changent leur forme en réponse aux influences physiologiques et aux forces. Les muscles par leur contraction exercent sur l'os un stress mécanique via les tendons qui est essentiel à la mise en forme de l'os (Olsen et al., 2000). Ainsi, pour leur majeure partie, la forme des os est le miroir des forces qui leurs sont appliquées au cours du développement. Le modelage osseux a lieu tout au long de la vie et est parfois impliqué dans certaines pathologies comme lorsque l'activité musculaire est réduite (chez les personnes hospitalisées ou réalisant de long voyages spatiaux en apesanteur), chez les personnes exposées à des thérapies à base de corticostéroïdes ou lors du vieillissement pour ne citer que quelques exemples.

III.2.3. Remodelage osseux

Enfin, le remodelage osseux est le mécanisme par lequel l'os ancien est remplacé par un os nouvellement formé. Ce processus est nécessaire à la fois pour assurer la solidité osseuse et l'homéostasie ionique. Le remodelage osseux est basé sur la formation d'une unité fonctionnelle dans laquelle les ostéoclastes, les ostéoblastes et les cellules endothéliales interagissent finement afin de coordonner la dégradation osseuse et le dépôt d'une nouvelle matrice minéralisée. Cette coordination étroite est contrôlée par des facteurs systémiques dont les hormones sexuelles et est souvent perturbée avec l'âge (les femmes étant plus sensibles du fait de la réduction hormonale liée à la ménopause). Dans ce cas, la dégradation osseuse n'est pas complètement compensée par la formation osseuse, conduisant à terme à une ostéoporose.

Le remodelage osseux peut être divisé en quatre phases distinctes : l'activation, la résorption, l'inversion et la formation (Eriksen et al., 2007)(Figure III.2). La phase d'activation correspond au recrutement et à l'activation des précurseurs hématopoïétiques qui se différencieront en ostéoclastes. Ces cellules sont amenées par les vaisseaux sanguins, migrent sous les ostéoblastes bordants et adhèrent à la surface osseuse où elles fusionnent et se différencient en ostéoclastes. Les ostéoclastes matures commencent l'étape de résorption au niveau de leur face ventrale où la matrice est

dégradée par solubilisation de sa partie inorganique et protéolyse de ses composants organiques. Les fragments digérés sont ensuite relargués dans la circulation, créant sous les ostéoclastes la « fosse de résorption » ou « resorption pit ». La troisième phase ou phase d'inversion correspond à la transition entre la fin de la résorption (due à l'apoptose ou la migration des ostéoclastes) et le dépôt d'une nouvelle matrice osseuse. Cette phase est caractérisée par l'arrivée de pré-ostéoblastes au niveau de la « fosse de résorption », ces derniers se différenciant ensuite en ostéoblastes matures et déposants afin d'initier la dernière phase qui est le dépôt d'une nouvelle matrice osseuse. Après cette dernière phase, les ostéoblastes meurent par apoptose pour la majorité d'entre eux. Toutefois, certains vont être pris dans la matrice osseuse et devenir des ostéocytes alors que d'autres vont entrer en quiescence à la surface de l'os et formeront une couche de cellules appelés ostéoblastes bordants ou « bone lining cells ».

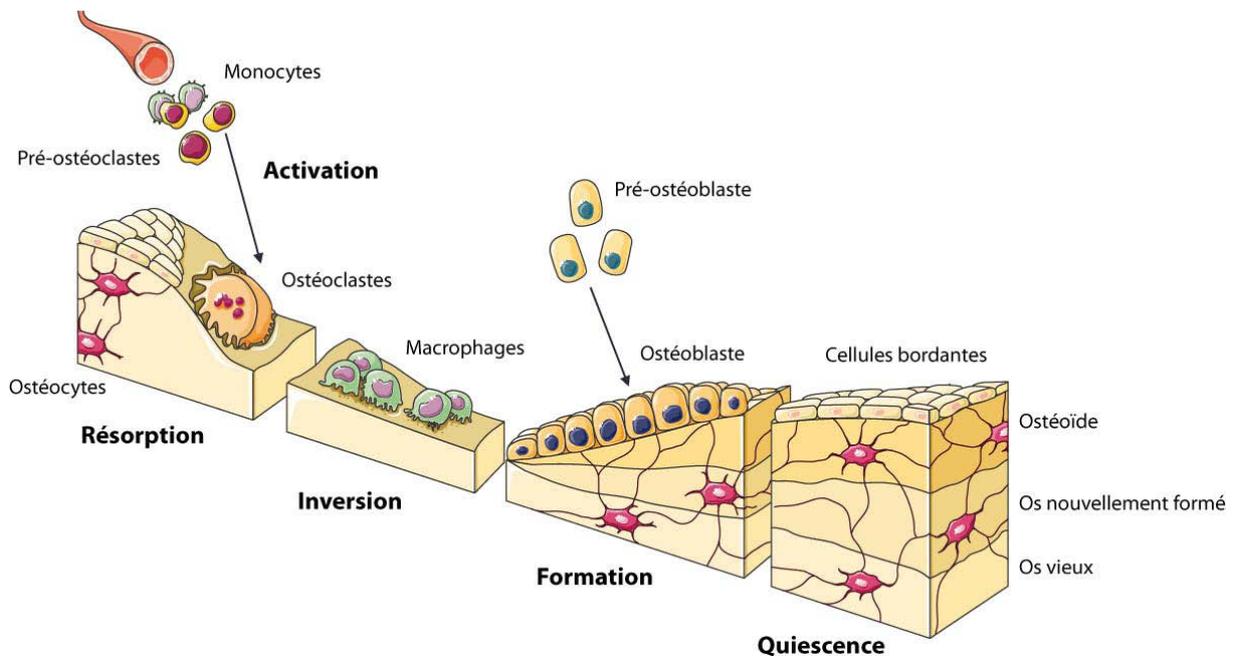


Figure III.2 : Les différentes phases du remodelage osseux. Le remodelage osseux se divise en 4 phases actives : activation, résorption, inversion et formation, suivies d'une phase de quiescence. Au cours de l'activation, les précurseurs ostéoclastiques provenant du sang se différencient. Ils dégradent ensuite la matrice osseuse minéralisée au cours de la phase de résorption. La phase d'inversion est caractérisée par la disparition principalement par apoptose des ostéoclastes et l'arrivée des ostéoblastes. Ces derniers vont synthétiser une nouvelle matrice osseuse au cours de la phase de formation. Enfin, les ostéoblastes meurent par apoptose ou deviennent des cellules bordantes ou des ostéocytes. Commence alors une phase de quiescence osseuse.

Les signaux exacts contrôlant toutes ces étapes ne sont pas encore complètement élucidés. Les vaisseaux sanguins, de même que la nature de la matrice sont des éléments

importants pour les phases d'activation et de résorption. Les ostéoclastes multi-nucléés peuvent migrer sur la surface osseuse jusqu'à atteindre une matrice appropriée pour la dégradation, c'est-à-dire une matrice minéralisée. Ainsi, il apparaît qu'une matrice faiblement minéralisée est plutôt inhibitrice pour les ostéoclastes (Agis et al., 2010). A l'opposé, on peut imaginer que le dépôt osseux sera stoppé quand la minéralisation aura atteint un certain niveau. Dans tous les cas, les propriétés physiques et chimiques de la matrice semblent être importantes pour coordonner à la fois les fonctions des ostéoclastes et des ostéoblastes.

III.3. Structure osseuse et composition de la matrice

Les os long sont morphologiquement très différents des os plats comme la calvaire mais aussi des vertèbres. En effet, la composition et la structure des os varient d'une pièce anatomique à l'autre, mais aussi à l'intérieur d'une même pièce. En métaphyse et en épiphyse, les os sont majoritairement constitués d'un réseau d'os trabéculaire en nid d'abeille. L'os cortical est présent en premier lieu dans la région centrale ou diaphysaire et forme une matrice très compacte et solide entourant l'espace central contenant la moelle osseuse (Figure III.3). A la surface de l'os cortical, une couche de tissu conjonctif fibreux externe forme le périosteum et une couche interne sépare l'os cortical de la moelle osseuse, l'endosteum. Le périosteum est un élément important pour la croissance appositionnelle de l'os ou la réparation de micro-dommages (Maes et al., 2010b).

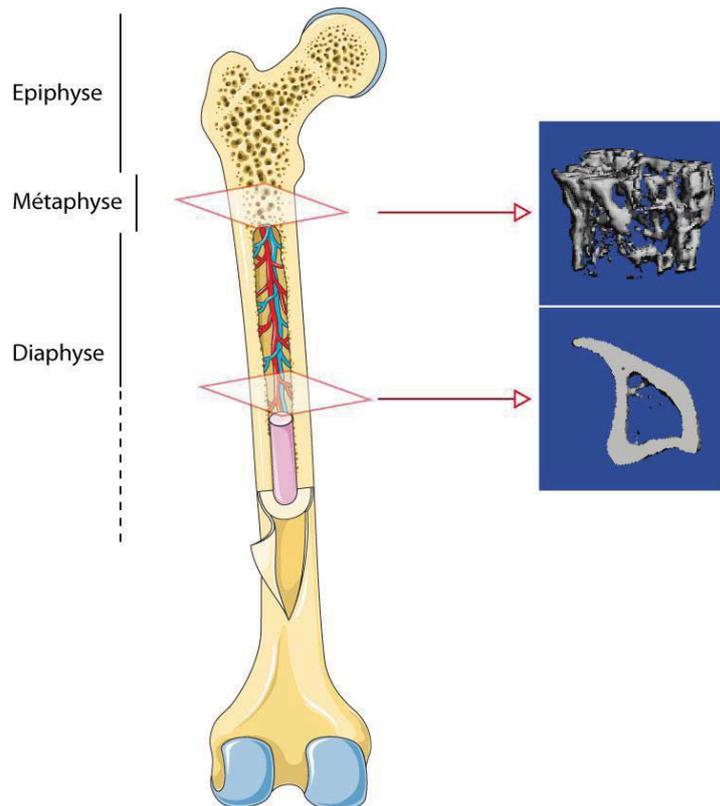


Figure III.3 : Les différentes architectures osseuses. Les os longs présentent deux grandes architectures osseuses. Au niveau métaphysaire, l'os est principalement composé d'un réseau de travées en nid d'abeille (image du haut) délimité par une zone d'os cortical (non représentée). En région diaphysaire, seul l'os cortical, beaucoup plus dense, est présent, délimitant une cavité centrale contenant la moelle osseuse (image du bas).

La matrice osseuse est composée de 50 à 70% de minéral, de 20 à 40% de matrice organique et de 5 à 10% d'eau. Cette composition varie considérablement entre l'os minéralisé et l'os nouvellement synthétisé non-minéralisé appelé l'ostéoïde, qui est principalement composé de fibres de collagène non organisées et d'autres protéines non collagéniques telles que l'intégrin-binding sialoprotéine (IBSP), l'ostéocalcine (OCN) ou l'ostéopontine (OPN). Cet ostéoïde est considéré comme un os spongieux fragile ayant une faible résistance aux forces mécaniques (Viguet-Carrin et al., 2006). Cette fragilité osseuse caractérise certaines pathologies telles que l'ostéomalacie, le rachitisme, la maladie de Paget, l'ostéosarcome ou encore la dysplasie fibreuse. Dans toutes ces pathologies, les patients présentent des fractures récurrentes et d'importantes déformations osseuses dues à une faible résistance osseuse longitudinale. Cette fragilité est souvent caractéristique d'un important renouvellement osseux conduisant à la surproduction par les ostéoblastes d'os faiblement minéralisé. En effet, la minéralisation est un processus lent qui permet le renforcement de l'os.

Le principal composant minéral de la matrice osseuse est l'hydroxyapatite $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ avec de faible quantité de carbonate, de magnésium et d'acide phosphatidique. Il semble que la nucléation cristalline soit favorisée par certains composants de la matrice organique tels que les collagènes, la dentin matrix protein 1 (DMP1), l'ostéonectine et la bone sialoprotein (BSP), alors que certaines enzymes comme la phosphatase alcaline (ALP) vont accroître localement la concentration en phosphate favorisant la croissance du cristal (Malaval et al., 2008). D'un autre côté, des protéines acides telles que la gamma-carboxyglutamic acid (Gla)-containing protein osseuse (BGP, aussi appelée ostéocalcine) et l'ostéopontine (OPN) vont avoir une action inhibitrice de la minéralisation (Shapses et al., 2003). Concernant la partie organique de l'os, 90% des protéines sont des collagènes, principalement de type I (Col1a1). Les protéines non-collagéniques représentant les 10% restants sont composées de plus de 850 différents membres. Lorsque l'on s'intéresse aux protéines de la MEC, les approches protéomiques révèlent que les protéines non-collagéniques les plus abondantes sont les biglycanes, les protéines Gla, l'ostéonectine et l'ostéopontine (bio.gps). Il est à noter que certaines protéines parmi lesquelles la fibronectine (FN), la vitronectine (VN), les laminines (les chaînes $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 2$ et $\gamma 1$ formant potentiellement les laminines 8 à 11), la BSP, l'ostéonectine et l'OPN sont reconnues par différentes intégrines et régulent probablement la fonction et/ou la différenciation ostéoblastique.

IV. LA LIGNEE OSTEOBLASTIQUE

IV.1. Les étapes de la différenciation ostéoblastique

IV.1.1. Origine de la lignée ostéoblastique

Bien que l'origine exacte des cellules formant l'os soit toujours un sujet de débat, il est clair que comme pour de nombreux tissus et organes, une réserve de cellules souches ou ostéoprogéniteurs est essentielle à l'homéostasie osseuse et à son renouvellement. Une niche périvasculaire caractérisée par l'expression des marqueurs STRO-1, CD146, α SMA (α -smooth muscle actin) et VCAM (vascular cell adhesion molecule) a été identifiée comme étant une source de progéniteurs mésenchymateux de la moelle osseuse (Ashton et al., 2004; Gronthos et al., 2003). Cette population cellulaire, localisée *in vivo* à

proximité des cellules endothéliales, est une population de cellules pluripotentes ayant la capacité de se différencier *in vitro* en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes. Des niches de précurseurs mésenchymateux α SMA positifs ont aussi pu être observées au niveau du périoste et des sutures (Kalajzic et al., 2008). Ces progéniteurs sont des cellules quiescentes *in vivo* qui présentent toutefois une importante capacité de prolifération et de différenciation leur permettant d'assurer le maintien de la population ostéoblastique nécessaire au remodelage osseux (Gronthos et al., 2003).

Ces précurseurs mésenchymateux doivent donc tout d'abord proliférer afin de maintenir leur nombre tout au long de la vie adulte puis ensuite se différencier pleinement afin d'assurer leur fonction de dépôt de la matrice osseuse. Cette étape de différenciation est caractérisée par la transition entre différents « stades de différenciation » caractérisés par l'expression de marqueurs spécifiques tels que Runx2, Ostérix (Osx), la phosphatase alcaline (ALP) et encore le collagène de type I (Col I).

IV.1.2. Les étapes de la différenciation et marqueurs associés

Bien que la définition de chaque stade de la différenciation ostéoblastique soit très complexe du fait de l'hétérogénéité des cellules de la lignée ostéoblastique, cette dernière peut être présentée comme un groupe de cellules incluant les progéniteurs mésenchymateux, les précurseurs ostéoblastiques, aussi appelé pré-ostéoblastes, les ostéoblastes immatures, les ostéoblastes matures ou ostéoblastes déposants, les ostéoblastes bordants ou « bone lining cells » et enfin, les ostéocytes (Figure IV.1.). Comme présenté plus haut, la lignée ostéoblastique dérive de cellules souches mésenchymateuses (CSM) qui sont des précurseurs communs aux lignées ostéoblastique, chondrocytaire et adipocytaire. Les CSM se différencient ensuite en pré-ostéoblastes exprimant les facteurs de transcription Runx2 et Dlx5, marqueurs précoces de l'engagement dans la lignée ostéoblastique. A ce stade, les cellules cessent de proliférer et continuent leur différenciation pour devenir des ostéoblastes immatures exprimant le facteur de transcription Ostérix (Osx). Elles mûrissent ensuite et deviennent des ostéoblastes fonctionnels déposant la matrice osseuse. Ces ostéoblastes matures sont caractérisés par l'expression de diverses protéines matricielles et impliquées dans

la minéralisation osseuse (ex. le collagène de type I, l'ostéocalcine (OCN), la phosphatase alcaline (ALP)...). Finalement, les ostéoblastes matures entrent en quiescence pour devenir des cellules bordantes, certains sont pris dans la matrice osseuse et deviennent des ostéocytes alors que la majorité d'entre eux meurt par apoptose. Les ostéoblastes bordants sont des cellules aplaties, présentes à la surface de la matrice osseuse et dont la fonction semble être la « protection » de l'os contre la dégradation par les ostéoclastes. Les ostéocytes, pour leur part, forment un réseau connectant ensemble les différentes cellules osseuses (ostéoblastes et ostéoclastes) afin de coordonner finement le remodelage osseux.

Au cours de la différenciation ostéoblastique, la transition d'un stade à l'autre dépend de l'expression de facteurs de transcription régulant chacun l'expression du suivant et des gènes nécessaires à la différenciation et la fonction ostéoblastique. Parmi ces facteurs de transcription, le premier exprimé est Runx2 (aussi connu sous le nom de Cbfa1 ou OSF2). Runx2, en plus de jouer un rôle dans la différenciation ostéoblastique (Otto et al., 1997), est un facteur nécessaire à la synthèse de la matrice et à la maturation ostéoblastique (Ducy et al., 1999). Au cours de la différenciation, Runx2 régule l'expression du facteur de transcription Ostérix (ou SP7) lui-même nécessaire à la transition du stade de pré-ostéoblaste à celui d'ostéoblaste immature. L'« activating transcription factor 4 » (ATF4) a aussi été identifié comme étant un élément clef de la différenciation ostéoblastique, permettant la différenciation terminale et l'expression de gènes spécifiques tels que l'ostéocalcine et le collagène de type I (Yang et al., 2004)(Figure IV.1.).

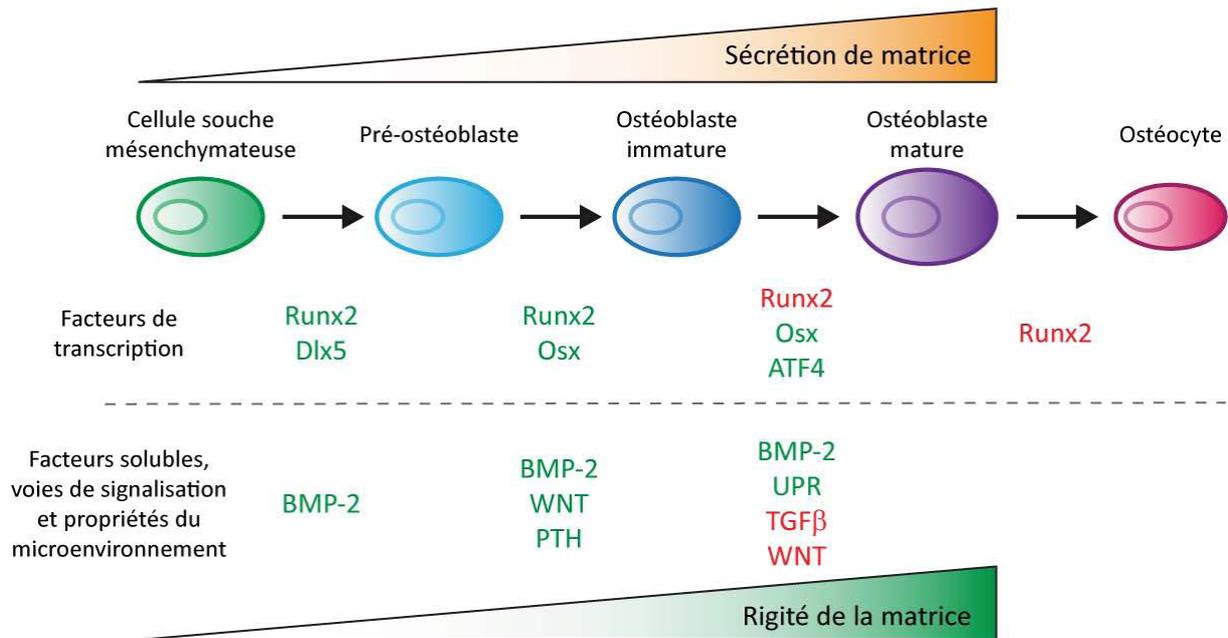


Figure IV.1 : Les différentes étapes de la différenciation ostéoblastique, facteurs de transcription et signalisation associés. Les ostéoblastes dérivent de cellules souches mésenchymateuses qui passent par les stades de pré-ostéoblaste et d'ostéoblaste immature avant de devenir des ostéoblastes matures pleinement fonctionnels sécrétant et organisant la matrice extracellulaire. Les ostéoblastes matures meurent ensuite par apoptose, ou deviennent des cellules bordantes ou des ostéocytes. Les facteurs de transcription permettant la transition d'un stade à l'autre sont représentés en vert, ceux bloquant cette transition sont représentés en rouge. De même, les facteurs solubles, voies de signalisation et propriétés du microenvironnement contrôlant l'expression de ces facteurs de transcription sont représentés en vert et en rouge pour les facteurs stimulant ou réprimant le passage d'un stade de différenciation à l'autre respectivement.

IV.2. Les différents signaux régulant la prolifération et la survie ostéoblastique

L'homéostasie osseuse nécessite un équilibre fin entre la prolifération des progéniteurs ostéoblastiques et leur différenciation en ostéoblastes déposants. Les facteurs de croissance mitogènes et les anti-mitogènes ont été décrit depuis longtemps comme des régulateurs importants de la croissance et de la prolifération cellulaire. Toutefois, il est aujourd'hui évident que le microenvironnement cellulaire et les propriétés de la matrice extracellulaire (physiques, chimiques...) sont aussi d'importants régulateurs de la croissance, de la prolifération et de la survie cellulaire.

IV.2.1. Les facteurs de croissance

Il est maintenant bien établi que la prolifération des progéniteurs ostéoblastiques est régulée par de nombreux facteurs solubles. Par exemple, les ligands WNT en activant la

voie dépendante de la β -caténine régulent la prolifération des progéniteurs ostéoblastiques. Cet effet a été mis en évidence par un défaut de prolifération important des progéniteurs ostéoblastiques lors de la délétion du co-récepteur des WNT, LRP5 (Kato et al., 2002). D'autres facteurs de croissance, tels que l'IGF (insulin-like growth factor), le VEGF (vascular endothelial growth factor)(Maes et al., 2010a) et le FGF (fibroblast growth factor) jouent également un rôle prépondérant dans la prolifération et la survie des progéniteurs ostéoblastiques (Bikle, 2008; Bikle et al., 1994; Montero et al., 2000) par l'activation de voies canoniques de signalisation telles que les voies MAPK/ERK, Pi3K/AKT ou β -caténine (Maes et al., 2010a).

IV.2.2. Le microenvironnement cellulaire

En plus des facteurs de croissance, d'autres éléments environnementaux tels que les propriétés et la nature de la matrice extracellulaire, de même que le stress découlant des mouvements de fluide dans le microenvironnement cellulaire (aussi appelé "fluid shear stress") influencent positivement ou négativement la prolifération et/ou la survie cellulaire. Selon la nature de la matrice (fibronectine, collagène ...), la prolifération et la survie ostéoblastiques sont différemment influencées. En effet, la fibronectine promeut la croissance et la survie cellulaire (Sottile et al., 1998) alors que le rôle du collagène de type I, principal composant de la matrice osseuse, est plus discuté. Il semblerait que le collagène de type I ait plutôt un effet antiprolifératif (Mathews et al., 2012). Toutefois, l'état de la matrice est aussi un élément important à prendre en compte. Par exemple, dans les cellules musculaires lisses, le collagène sous sa forme polymérisée a un effet antiprolifératif contrairement au tropocollagène monomérique (Koyama et al., 1996). L'effet de la polymérisation du collagène n'a pas encore été étudié pour les ostéoblastes mais il est tentant de transposer aux ostéoblastes des données obtenues à partir de cellules endothéliales pour lesquelles la nature de la matrice a clairement été montrée comme affectant spécifiquement la signalisation cellulaire (Funk et al., 2010; Mettouchi et al., 2001; Orr et al., 2006; Pozzi et al., 1998). En plus du collagène de type I, d'autres molécules de la MEC ont une influence sur la prolifération ostéoblastique. Parmi elles, on pourra citer la famille des protéines SIBLING (small integrin-binding ligand, N-linked glycoprotein) dont les composants les plus connus sont l'ostéopontine (OPN) et la bone sialoprotein (BSP). L'expression de la BSP et de l'OPN augmente au cours de la différenciation ostéoblastique et ces deux protéines régulent négativement la

prolifération ostéoblastique (Gordon et al., 2007; Huang et al., 2004). En plus de sa composition et de son état, les propriétés physiques de la matrice (rigidité, élasticité...) peuvent influencer la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire. Par exemple, des matrices molles auront un effet antiprolifératif comparées à des matrices plus rigides qui seront pour leur part plutôt pro-prolifératives (Weng and Fu, 2011).

IV.3. Les différents signaux régulant la différenciation ostéoblastique

IV.3.1. Les facteurs solubles

L'expression et l'activation/répression des différents facteurs de transcription nécessaires à la progression de la différenciation ostéoblastique sont régulées par toute une gamme de voies de signalisation, elles-mêmes contrôlées à chaque étape de la différenciation ostéoblastique par différents facteurs solubles tels que les facteurs de croissance ou les hormones.

IV.3.1.1. Les BMPs

Parmi ces voies et facteurs solubles associés, les BMPs (bone morphogenetic proteins) comptent parmi les plus étudiés. Les BMPs sont des protéines de la famille du TGF β (transforming growth factor- β) qui, lorsqu'elles se fixent sur leur récepteur hétérotetramérique à activité Ser/thr kinase (BMPRI et BMPRII), activent par phosphorylation les protéines SMADs (SMAD-1, -5 et -8). Une fois phosphorylées, ces SMADs, dites R-SMADs vont interagir avec SMAD-4, une co-SMAD, et être transloquées dans le noyau où elles réguleront l'expression de gènes cibles tels que les BMPs elles-mêmes et certaines protéines de la matrice extracellulaire comme le collagène de type I, l'ALP, l'OPN ou encore la BSP. Les BMPs peuvent aussi activer des voies de signalisation ne passant pas par les SMADs, telles que la voie Pi3K/AKT (Ghosh-Choudhury et al., 2002) et les voies MAPK/p38, MAPK/ERK (Gallea et al., 2001), et JNK (Guicheux et al., 2003). L'importance des BMPs et principalement des BMP-2 et -4 dans la différenciation ostéoblastique a été mise en évidence par de nombreuses études. En effet, la délétion des BMP-2 et -4 au cours du développement conduit à un défaut majeur dans la mise en place du tissu osseux, ces BMPs étant nécessaires à la transition du pré-ostéoblaste

(Runx2+) à l'ostéoblaste immature (Runx2+ Osx+)(Figure IV.1). La délétion de la BMP-2 dans le mésenchyme à l'origine de la formation du membre souligne son rôle indispensable dans la formation osseuse post-natale et l'ostéogenèse (Bandyopadhyay et al., 2006). Il est intéressant de noter que la délétion du récepteur aux BMPs, BMPRIA induit non pas une diminution mais une augmentation de la masse osseuse via une diminution de l'activité ostéoclastique (Kamiya et al., 2010; Kamiya et al., 2008a; Kamiya et al., 2008b). Ceci s'explique par le fait que la signalisation BMP régule l'expression de la Sclérostine (SOST), un inhibiteur de la voie WNT, elle-même bloquant l'ostéoclastogenèse et donc la résorption osseuse (Kamiya et al., 2008b). En plus de leur effet sur la différenciation ostéoblastique, les BMPs jouent un rôle important dans la fonction ostéoblastique. En effet, la délétion du BMPRII chez l'ostéoblaste mature, de même que la délétion de SMAD-4 et la surexpression de Noggin (un inhibiteur de la voie BMP), induisent une diminution de l'activité ostéoblastique (Devlin et al., 2003; Mishina et al., 2004; Tan et al., 2007). Ainsi, les BMPs, par l'activation de voies SMAD et non-SMAD, régulent à la fois la différenciation, la fonction ostéoblastique mais aussi le couplage entre ostéoblastes et ostéoclastes.

IV.3.1.2. Les WNTs

Les voies de signalisation dépendantes des facteurs diffusibles WNTs ont, elles-aussi, une importance majeure pour la prolifération, la différenciation et la fonction ostéoblastique. Les glycoprotéines WNTs peuvent activer une voie soit dépendante, soit indépendante de la β -caténine, impliquant l'activation de la protéine kinase C (PKC). Différents laboratoires ont montré l'importance de l'activation de la voie β -caténine dépendante par l'interaction des ligands WNT avec le récepteur Frizzled et les co-récepteurs LRP5 et LRP6 dans la différenciation ostéoblastique. En effet, chez l'homme la mutation du co-récepteur LRP5 conduit au syndrome d'ostéoporose avec pseudogliome, un syndrome rappelant l'ostéoporose juvénile (Gong et al., 2001). A l'inverse, des mutations de LRP5 le rendant insensible aux inhibiteurs tels que DKK ou SOST sont responsables de syndrome d'ostéopérose soulignant le rôle de la signalisation WNT dans la formation osseuse (Boyden et al., 2002; Little et al., 2002). Plus précisément, il a été montré que la signalisation dépendante de la β -caténine était nécessaire à la transition du pré-ostéoblaste (Runx2+) vers l'ostéoblaste immature (Runx2+ Osx+)(Hu et al., 2005)(Figure IV.1). De plus, des travaux ont montré que la voie

WNT/ β -caténine était importante chez les ostéo-chondroprogéniteurs pour l'engagement dans la lignée ostéoblastique (Hill et al., 2005; Rodda and McMahon, 2006) et pour la maturation, la fonction et la prolifération ostéoblastique (Holmen et al., 2005; Kato et al., 2002; Rodda and McMahon, 2006).

En plus de son rôle dans la différenciation ostéoblastique, la signalisation WNT est aussi impliquée dans l'équilibre entre ostéoblastes et ostéoclastes. En effet, l'activation de la voie WNT chez les ostéoblastes régule positivement l'expression d'OPG et négativement l'expression de RANKL (respectivement inhibiteur et activateur des ostéoclastes) conduisant ainsi à la répression de la résorption osseuse par les ostéoclastes (Glass et al., 2005; Holmen et al., 2005). Enfin, une voie WNT, β -caténine indépendante mais PKC δ -dépendante régule la transition du pré-ostéoblaste en ostéoblaste immature (Tu et al., 2007)(Figure IV.1) soulignant la complexité du rôle de la signalisation WNT dans la formation osseuse.

IV.3.1.3. Les FGFs

Parmi les autres facteurs de croissance nécessaires à la différenciation ostéoblastique, les fibroblast growth factors (FGFs) occupent aussi une place importante. Les FGFs forment une grande famille comprenant 22 membres chez l'homme et la souris. La majorité des FGFs se lie à des récepteurs à activité tyrosine kinase, les FGFR-1 à 4, conduisant à la phosphorylation de protéines de signalisation telles que les MAPKs, la phosphoinositide 3-kinase (Pi3K), STAT1 et PKC (Eswarakumar et al., 2005). Comme le révèle l'analyse des différents mutants des FGFs et de leurs récepteurs, ces derniers ont des rôles bien distincts dans la prolifération, la différenciation, et la fonction ostéoblastique. Le FGF-2 semble impliqué dans la prolifération des précurseurs ostéoblastiques et la fonction des ostéoblastes matures (Montero et al., 2000). Le FGF-18 pour sa part est impliqué dans les étapes plus tardives de la différenciation, puisque n'étant pas indispensable à l'expression de Runx2 (Liu et al., 2007; Ohbayashi et al., 2002). Toutefois, la situation est bien plus complexe car les divers récepteurs aux FGFs eux-mêmes ont des effets spécifiques. En effet, alors que le FGFR-1 promeut la différenciation précoce des ostéoblastes et bloque la minéralisation (Jacob et al., 2006), le FGFR-2 semble plutôt favoriser la prolifération des pré-ostéoblastes et la fonction des ostéoblastes matures (Yu et al., 2003). Le FGFR-3 pour sa part inhibe la prolifération des

pré-ostéoblastes mais est nécessaire à la minéralisation de l'ostéoïde (Valverde-Franco et al., 2004).

IV.3.1.4. IHH

Un autre facteur de croissance impliqué dans la formation osseuse est Indian Hedgehog (IHH) et la signalisation qui lui est associée. En liant le récepteur Patched homolog 1 (PTCH1), IHH signale via la protéine transmembranaire Smoothed (SMO) de manière à activer ou réprimer les facteurs de transcription de la famille GLI (GLI-1 et -2 ou GLI-3 respectivement). La signalisation Hedgehog joue principalement un rôle dans l'ossification endochondrale. En effet, l'expression d'IHH par les chondrocytes hypertrophiques est nécessaire à l'expression de Runx2 par les pré-ostéoblastes environnants (Long et al., 2004; Tu et al., 2011).

IV.3.1.5. La PTH et la PTHrP

Des facteurs systémiques sont aussi impliqués dans la différenciation et la fonction ostéoblastiques. Parmi ces derniers on soulignera le rôle important de l'hormone parathyroïde (PTH). Cette dernière est sécrétée par les glandes parathyroïdes en réponse à un faible niveau de calcium sérique et stimule alors la résorption osseuse par les ostéoclastes, entraînant un relargage de TGF β depuis la matrice osseuse. Ceci induit en retour le recrutement de précurseurs mésenchymateux sur la surface osseuse et leur différenciation (Tang et al., 2009). La PTH a donc un premier effet catabolique suivi d'un rétrocontrôle négatif résultant en un effet anabolique sur la formation osseuse. Alors que la PTH est synthétisée par les glandes parathyroïdes, la parathyroid hormone-related protein (PTHrP) est, elle, synthétisée et sécrétée par différents tissus tels que la peau, les muscles lisses, les chondrocytes des plaques de croissance, l'os, le rein ... Il a été montré que cette hormone était indispensable à l'ossification endochondrale. En effet, la délétion de la PTHrP ou de son récepteur chez la souris conduit à une mort périnatale caractérisée par d'importantes malformations du squelette (Amizuka et al., 1994; Karaplis et al., 1994) et l'haploinsuffisance de la PTHrP est à l'origine d'une réduction du volume osseux trabéculaire chez la souris (Miao et al., 2005).

Ainsi, de nombreux facteurs solubles (facteurs de croissance, hormones...), systémiques ou non, permettent une régulation fine de la formation et de la résorption osseuse en fonction de stimuli de diverses natures et origines.

IV.3.2. Le microenvironnement cellulaire

Bien que les facteurs solubles jouent un rôle important dans la différenciation ostéoblastique, il apparaît aujourd'hui clairement que le microenvironnement cellulaire apporte lui aussi une somme d'informations indispensables à la régulation spatiotemporelle de la différenciation et de la fonction ostéoblastiques.

Alors que l'on pourrait s'attendre à ce que des matrices pro-prolifératives bloquent la différenciation ostéoblastique et à l'inverse que des matrices anti-prolifératives supportent la différenciation, il se trouve que le tableau est beaucoup plus complexe lorsque l'on s'intéresse au rôle des matrices dans la différenciation ostéoblastique. En effet, les matrices caractérisées comme pro-prolifératives ne bloquent pas nécessairement la différenciation et inversement. Par exemple, il est maintenant établi que l'interaction avec la fibronectine, principalement via les intégrines $\alpha 5\beta 1$, qui favorise la prolifération cellulaire est aussi nécessaire à la différenciation ostéoblastique et à la minéralisation (Moursi et al., 1997). Cet effet est médié par l'activation de l'expression de protéines telles que l'ALP ou l'OCN. Toutefois l'organisation par les cellules d'une matrice favorable à la minéralisation et à la formation de nodules osseux pourrait aussi être un déterminant important pour la différenciation cellulaire (Moursi et al., 1997). Le rôle du collagène de type I dans la différenciation ostéoblastique a été caractérisé. En effet, des anticorps dirigés contre le collagène de type I ou ses récepteurs intégrines bloquent la différenciation précoce dépendante du BMP-2 (Jikko et al., 1999), soulignant le lien entre les facteurs de croissance tels que le BMP-2 et les signaux provenant de la matrice. Une hypothèse séduisante serait que les ostéoprogéniteurs et les ostéoblastes doivent intégrer les signaux appropriés provenant des facteurs de croissance sur une matrice permissive dans le but de se différencier en ostéoblastes déposants. Ce mécanisme permettrait donc une régulation temporelle et spatiale de la prolifération et de la différenciation ostéoblastique.

Concernant les autres composants de la matrice extracellulaire, leur rôle dans la différenciation ostéoblastique est encore peu connu et nécessite de plus amples investigations. Toutefois, même si la BSP et l'OPN ont des rôles similaires sur la prolifération ostéoblastique (Gordon et al., 2007; Huang et al., 2004), leurs effets sur la

différenciation ostéoblastique et la minéralisation semblent différents. Tandis que des données *in vitro* suggèrent que l'OPN inhibe la croissance cristalline (Boskey et al., 1993), la BSP semble initier la formation de cristaux d'hydroxyapatite dans la matrice osseuse (Hunter and Goldberg, 1994). De plus, l'OPN inhibe la différenciation des ostéoblastes en bloquant les signalisations dépendantes de la BMP-2 et de la PTH (Huang et al., 2004; Ono et al., 2008). Toutefois, il est intéressant de noter que les souris délétées pour l'OPN (OPN^{-/-}) ont un développement et une structure osseuse normaux mais présentent une perte osseuse moins importante après décharge, du fait d'un défaut de résorption osseuse et d'une absence de suppression de la formation osseuse (Ishijima et al., 2002; Rittling et al., 1998). Au contraire, la BSP est nécessaire à la différenciation des ostéoblastes *in vitro* (Gordon et al., 2007) et à la formation osseuse primaire *in vivo*. En effet, les souris BSP^{-/-} présentent un retard de minéralisation dû à un blocage de la différenciation finale des ostéoblastes (Wade-Gueye et al., 2012). Cette complexité de signaux provenant de la matrice souligne bien la nécessité d'un contrôle fin de la prolifération, de la différenciation et de la minéralisation au cours de la formation et de l'homéostasie osseuse.

De manière similaire, la rigidité matricielle conduit la différenciation de cellules souches mésenchymateuses (CSM) vers la lignée ostéoblastique et promeut la différenciation des pré-ostéoblastes contrairement aux matrices souples (Engler et al., 2007; Khatiwala et al., 2009)(Figure IV.1). Les matrices rigides induisent *in vitro* la différenciation ostéoblastique via l'activation de la voie MAPK/ERK conduisant à l'activation de Runx2 (Khatiwala et al., 2009). Toutefois, à ce jour, aucune étude n'a transposé ces résultats *in vivo* et l'étude des effets de la rigidité de la matrice *in vivo* représente toujours un challenge technique.

Pour conclure, la MEC représente un élément important pour la régulation de la prolifération et de la différenciation, permettant à la fois le maintien d'une population de pré-ostéoblastes et la différenciation d'ostéoblastes à l'endroit approprié pour la formation et le remodelage osseux.

RESULTATS

SYNTHESE DES RESULTATS

Les données actuelles concernant le rôle de la protéine ICAP-1 α indiquent clairement son rôle dans la régulation de l'affinité des intégrines à chaîne β 1 et par là même dans la dynamique des adhérences (Bouvard et al., 2003; Millon-Fremillon et al., 2008). Par exemple, ICAP-1 α , en partie en régulant la fixation de la taline sur le domaine cytoplasmique de l'intégrine β 1, ralentit la phase d'assemblage des adhérences focales, et module ainsi des processus dynamiques tels que l'adhérence cellulaire et la migration. De plus, il a pu être montré qu'ICAP-1 α était nécessaire à la perception de l'environnement cellulaire et plus particulièrement de la densité de surface de la matrice extracellulaire par les cellules. Finalement, même si la protéine ICAP-1 α a principalement été étudiée pour son rôle dans les processus liés à l'adhérence cellulaire, il n'en reste pas moins qu'elle participe aussi à la régulation d'autres fonctions comme la prolifération cellulaire qui, bien que liées à l'adhérence cellulaire, font intervenir de très nombreux facteurs.

L'analyse du phénotype de souris après délétion du gène *Icap-1* a permis de mettre en évidence un rôle d'ICAP-1 α dans la mise en place du tissu osseux. Nous avons ainsi montré qu'ICAP-1 α participait à la fois à la prolifération des ostéoprogéniteurs et à l'étape de condensation nécessaire à la différenciation de ces derniers en ostéoblastes et à la formation des nodules minéralisés.

La première partie de cette thèse porte donc sur la caractérisation du mode d'action de la protéine ICAP-1 α dans les étapes de condensation et de différenciation des ostéoprécurseurs. Nous nous sommes pour cela intéressés au rôle de l'intégrine β 1 et de l'un de ses ligands majeur, la fibronectine, dans cette étape de compaction. Nous avons pu montrer que l'organisation de la matrice de fibronectine était nécessaire à cette étape et qu'ICAP-1 α en régulant l'affinité de l'intégrine β 1 y participait. En effet, l'analyse de la dynamique des adhérences par microscopie a permis de mettre en évidence que la protéine ICAP-1 α était nécessaire à l'assemblage de la matrice de fibronectine en contrôlant la dynamique de la formation des adhérences fibrillaires. Moléculairement, ICAP-1 α a une action antagoniste sur le recrutement de l'activateur des intégrines, la kindline-2, sur le domaine cytoplasmique des intégrines β 1. L'utilisation de cellules surexprimant la kindline-2 nous a permis de démontrer que cet équilibre ICAP-1/kindline-2 était important pour le contrôle de la formation des adhérences fibrillaires

et pour l'assemblage de la matrice de fibronectine. Finalement, nous avons pu mettre en évidence que l'organisation de la matrice de fibronectine était un prérequis au dépôt d'une matrice de collagène permissive à la minéralisation et donc à la formation d'un tissu osseux minéralisé et fonctionnel chez la souris.

Au vu des résultats obtenus concernant le rôle de la protéine ICAP-1 α dans la formation du tissu osseux, nous avons naturellement été amenés à étudier le rôle de l'intégrine β 1 elle-même dans ce même processus. Les données actuelles de la littérature sont assez controversées dans ce domaine. Les études *in vitro* suggèrent en effet un rôle majeur de l'intégrine β 1 dans la différenciation ostéoblastique. Toutefois, la délétion chez la souris de l'intégrine β 1 dans la lignée ostéoblastique à un stade tardif (déposant) n'induit pas de phénotype majeur, ce qui contraste avec le phénotype marqué des souris déficientes pour ICAP-1 α . Nous sommes donc partis de l'hypothèse selon laquelle la délétion réalisée dans le cadre de cette étude était trop tardive pour permettre l'étude du rôle de l'intégrine β 1 dans la différenciation de l'ostéoblaste. En utilisant le même système de délétion (système Cre/Lox) mais un promoteur plus précoce pour l'expression de la recombinaison Cre, nous avons pu mettre en évidence l'importance de l'intégrine β 1 au cours de la différenciation ostéoblastique. Par l'analyse *in vivo*, puis la génération de lignées ostéoblastiques à partir de calvaires de souris mutantes et leur étude *in vitro*, nous avons montré que les intégrines à chaîne β 1 avaient un rôle à la fois dans la prolifération des ostéo-précurseurs mais aussi dans l'induction des gènes de différenciation ostéoblastique. L'analyse des cellules déficientes pour l'intégrine β 1 nous a permis d'identifier les bases moléculaires du défaut de prolifération de ces précurseurs et de mieux comprendre le lien entre l'adhérence cellulaire, le phénomène d'endocytose et la régulation d'un acteur majeur de la prolifération, la protéine YAP. Parallèlement, nos résultats montrent que la réponse aux facteurs de différenciation tels que les BMPs, et par là même la différenciation ostéoblastique, via l'expression de gènes de différenciation comme le facteur de transcription Ostérix ou la phosphatase alcaline sont sous la dépendance des intégrines à chaîne β 1.

I. LA PROTEINE ICAP-1 α COMPETITEUR DE LA KINDLINE-2 POUR L'INTEGRINE β 1 REGULE LA FORMATION DES ADHERENCES FIBRILLAIRES, LA FIBRILLOGENESE DE FIBRONECTINE ET PAR CONSEQUENT LA MINERALISATION DU TISSU OSSEUX.

I.1. Introduction

La matrice extracellulaire par sa composition, ses propriétés physiques, mais aussi du fait qu'elle soit un réservoir pour des facteurs de croissance tels que les BMPs ou les FGFs (Hynes, 2009) joue un rôle majeur dans le maintien de l'intégrité tissulaire. Ce maintien nécessite de nombreux processus cellulaires tels que l'adhérence, la prolifération ou encore la différenciation cellulaire. L'interaction cellule/matrice est toutefois bidirectionnelle puisque c'est la cellule elle-même qui va sécréter et assembler la matrice extracellulaire. Ce sont les intégrines, présentes à la surface cellulaire, qui assurent, en grande partie, le lien entre la cellule et la matrice extracellulaire (MEC) (Hynes, 1992). Les intégrines sont donc déterminantes à la fois pour l'organisation de la MEC et pour la régulation des fonctions cellulaires citées précédemment (Bouvard et al., 2001).

L'os est un tissu très particulier du point de vu de l'environnement matriciel puisque l'une de ses fonctions est justement de fournir une matrice minéralisée suffisamment résistante pour servir de support et assurer le maintien de l'organisme tout entier. La formation et le remodelage du tissu osseux font intervenir deux acteurs principaux, les ostéoblastes organisant la matrice osseuse et la minéralisant, et les ostéoclastes la résorbant.

Malgré l'importance des interactions cellule/matrice dans ce tissu, le rôle des intégrines à chaîne β 1 dans la physiologie de l'ostéoblaste reste encore méconnu et controversé. Bien que des études menées *in vitro* suggèrent un rôle majeur de l'intégrine β 1 dans la différenciation et la fonction de l'ostéoblaste (Moursi et al., 1996; Wang et al., 2006), les données obtenues *in vivo* sont beaucoup moins claires. En effet, la délétion du gène de l'intégrine β 1 dans l'ostéoblaste mature n'induit pas de défaut fonctionnel ni de problème de développement majeur chez la souris (Phillips et al., 2008).

Dans cette étude, nous apportons une explication moléculaire à la question suivante : comment ICAP-1 α en régulant l'activation de l'intégrine β 1 affecte la fonction ostéoblastique? Nous avons pu montrer qu'ICAP-1 α , en entrant en compétition avec la Kindline-2, un activateur des intégrines se liant sur le domaine cytoplasmique de la sous-unité β , permet la dynamique des adhérences fibrillaires, structures d'adhérence nécessaires à l'organisation de la matrice de fibronectine. Nous avons mis en évidence que l'organisation de la matrice de fibronectine par les ostéoblastes était indispensable au dépôt d'une matrice de collagène de type I et à sa minéralisation. Ainsi, ICAP-1 α en régulant l'activation des intégrines β 1 via sa compétition avec la Kindline-2 permet l'organisation d'une matrice osseuse propre à la minéralisation.

I.2. Synthèse des résultats

ICAP-1 α en régulant l'organisation matricielle de la fibronectine permet la compaction des cellules ostéoblastiques.

Alors que des cellules ostéoblastiques sauvages (Icap-1^{+/+}) ou déficientes en Icap-1 α et ré-exprimant la protéine ICAP-1 α (Icap-1^{wt}) se compactent pour former des sphéroïdes lorsqu'elles sont cultivées en goutte suspendue, les cellules n'exprimant pas ICAP-1 α (Icap-1 α ^{-/-}) présentent un défaut de compaction (article ; figure 1A). Nous avons pu montrer que cet effet était dépendant de l'intégrine β 1 et d'un de ses ligands majeurs, la fibronectine. En effet, la délétion de l'intégrine β 1 (β 1^{-/-}), de la fibronectine (FN^{-/-}) ainsi que l'utilisation d'un peptide bloquant l'auto-assemblage de la fibronectine (FUD) reproduisent tous trois, de manière plus ou moins importante, le défaut de compaction observé pour les cellules Icap-1 α ^{-/-} (article ; figure 1B et C). L'analyse de l'organisation de la matrice de fibronectine à l'aide de différentes lignées nous a permis de caractériser le rôle majeur de la protéine ICAP-1 α dans l'assemblage d'une matrice de fibronectine organisée autant en culture en 2D qu'en 3D dans les sphéroïdes obtenus en goutte suspendue (article ; figure 2 et données supplémentaires). De plus, l'observation des effets additionnels de la perte d'ICAP-1 α et de l'inhibition de la contractilité cellulaire par l'inhibition de ROCK (article ; figure 1D) nous a permis de replacer ces deux acteurs dans deux voies de signalisation séparées et non dans une même voie linéaire. Ainsi,

l'effet d'ICAP-1 α sur la fibrillogénèse de fibronectine est additif à l'activation de la voie RhoA/ROCK et de la contractilité cellulaire.

En conclusion, cette partie du travail démontre que l'intégrine β 1, ICAP-1 α et la fibronectine sont nécessaires à la compaction des cellules ostéoblastiques.

L'assemblage de la fibronectine par les ostéoblastes est dépendant de l'interaction directe entre ICAP-1 α et l'intégrine β 1.

ICAP-1 α ayant été caractérisé comme étant un régulateur négatif de l'affinité et de la fonction des intégrines à chaîne β 1 (Bouvard et al., 2003), nous avons voulu savoir si l'effet d'ICAP-1 α sur l'organisation de la fibronectine passait par son action sur l'intégrine β 1. Pour cela, nous avons généré un mutant d'intégrine β 1 n'interagissant pas avec ICAP-1 α (β 1^{V787T}) mais conservant sa capacité à interagir avec d'autres partenaires comme les kindlins. La perte d'interaction entre l'intégrine β 1 et ICAP-1 α reproduit le phénotype de perte d'ICAP-1 α (article ; figure 3) indiquant que l'effet d'ICAP-1 α sur l'organisation de la fibronectine nécessite sa liaison à l'intégrine β 1. De manière intéressante, alors que la mutation activatrice de l'intégrine β 1 D759A reproduit l'effet de la perte d'ICAP-1 α sur la dynamique des adhérences focales, elle n'interfère pas avec l'organisation de la fibronectine (article ; figure 3). Nous avons ensuite voulu savoir si le défaut de fibrillogénèse de fibronectine était associé à un défaut de remodelage et de réorganisation d'une matrice de fibronectine préexistante. Pour ce faire, les différentes lignées cellulaires ont été ensemencées sur une matrice de fibronectine durant 3 heures et l'organisation de la matrice de fibronectine a ensuite été analysée par immunofluorescence (article ; figure 4). Ceci nous a permis de mettre en évidence qu'ICAP-1 α contrôle le remodelage et la réorganisation d'une matrice de fibronectine préexistante.

La protéine ICAP-1 α est nécessaire à la formation des adhérences fibrillaires, structures d'adhérence responsables de l'assemblage de la fibronectine.

Puisque ICAP-1 α joue un rôle important dans la fibrillogénèse de fibronectine via son interaction avec l'intégrine β 1, nous nous sommes intéressés à la formation des structures d'adhérence responsables de cette fibrillogénèse dans nos différentes lignées

cellulaires exprimant ou non Icap-1 α . Par immunofluorescence et vidéomicroscopie, nous avons pu mettre en évidence la quasi absence d'adhérences fibrillaires dans les cellules déficientes en ICAP-1 α (article ; figure 5 et 6). Nos expériences indiquent clairement une distribution anormale de la taline (marqueur des adhérences focales), de la tensine (marqueur des adhérences fibrillaires) et de l'intégrine β 1 dans les structures d'adhérence formées par les cellules déficientes en ICAP-1 α (article ; figure 5C), soulignant le rôle d'ICAP-1 α dans l'organisation des adhérences fibrillaires.

La protéine ICAP-1 α contrôle la fibrillogénèse de fibronectine en régulant négativement la liaison de la kindline-2 sur l'intégrine β 1.

Afin de comprendre les événements moléculaires régissant l'organisation des adhérences fibrillaires dépendante d'ICAP-1 α et de la kindline-2 (qui partagent le même site d'interaction sur le domaine cytoplasmique de l'intégrine β 1), nous avons examiné l'effet d'ICAP-1 α sur l'interaction de la kindline-2 avec l'intégrine β 1. L'analyse des interactions moléculaires par "pull-down" nous a ainsi permis de mettre en évidence une compétition entre ICAP-1 α et la kindline-2 vis-à-vis de leur liaison au domaine cytoplasmique de l'intégrine β 1. En effet, la surexpression d'ICAP-1 α réduit la fixation de la kindline-2 sur l'intégrine β 1 (article ; figure 7B). Nous avons enfin confirmé cette compétition en surexprimant la kindline-2. En effet, si ICAP-1 α inhibe la fixation de la kindline-2 sur l'intégrine β 1, la surexpression de la kindline-2 devrait mimer le phénotype des cellules n'exprimant pas ICAP-1 α . Comme attendu, la surexpression de la kindline-2 conduit à un défaut de fibrillogénèse de fibronectine semblable à celui observé lors de la perte d'ICAP-1 α (article ; figure 7C). ICAP-1 α régule donc la formation des adhérences fibrillaires et l'assemblage de la fibronectine via sa compétition avec un activateur des intégrines, la kindline-2, au niveau du domaine cytoplasmique de l'intégrine β 1.

L'organisation de la fibronectine et de sa matrice associée sont nécessaires à la minéralisation.

Il a précédemment été rapporté que les souris déficientes en ICAP-1 α présentent des défauts de prolifération, de différenciation et de minéralisation ostéoblastiques. Nous nous sommes donc demandé si le défaut de minéralisation observé chez ces souris pouvait être dû au défaut d'organisation de la matrice de fibronectine observé en

absence d'ICAP-1 α . Pour cela nous avons analysé la capacité de minéralisation des différentes lignées utilisées précédemment et pu corrélérer la capacité d'assemblage de la fibronectine à la capacité de minéralisation. En effet, les lignées présentant un défaut de fibrillogénèse de fibronectine ($\beta 1^{-/-}$; $\beta 1^{V787T}$; Icap-1 $\alpha^{-/-}$; wt traitées au FUD; ostéoblastes surexprimant la kindline) présentent toutes un défaut de minéralisation (article ; figure 8 et 9). De plus, le défaut d'assemblage de la matrice de fibronectine a été corrélé chez les cellules déficientes pour ICAP-1 α avec un défaut d'assemblage de la matrice de collagène. En outre, l'apport d'une matrice de collagène de type I exogène à des cellules déficientes pour ICAP-1 α permet de restaurer partiellement la minéralisation des cultures (article ; figure 9B et C). Ainsi, nous avons montré qu'ICAP-1 α en contrôlant l'organisation de la matrice de fibronectine, régule l'organisation et le dépôt des fibres de collagène nécessaires à la minéralisation ostéoblastique.

I.3. Discussion

Notre étude a mis en évidence la nécessité de l'organisation d'une matrice de fibronectine et de collagène de type I par les ostéoblastes dans le processus de minéralisation et dans la mise en place du tissu osseux. La protéine ICAP-1 α , en bloquant le recrutement de la kindline-2 sur l'intégrine $\beta 1$, inhibe la formation des adhérences fibrillaires nécessaires à l'organisation et au remodelage de la fibronectine. Cette étude constitue la première preuve de l'implication d'un compétiteur dans la liaison de la kindline-2 sur l'intégrine $\beta 1$ et de l'importance d'un régulateur négatif de l'affinité des intégrines dans la formation des adhérences fibrillaires et l'organisation de la fibronectine. Nos résultats permettent d'expliquer pourquoi la délétion germinale d'Icap-1 α chez la souris bloque la différenciation et la prolifération *in vitro* et *in vivo* et pourquoi les ostéoblastes déficients pour Icap-1 α présentent des défauts d'adhésion, de compaction et de migration.

I.3.1. ICAP-1 α et l'intégrine $\beta 1$, deux acteurs majeurs de l'assemblage de la matrice de fibronectine

Il a été montré précédemment dans l'équipe que la mutation D759A, pré-activatrice de l'intégrine $\beta 1$ par rupture du pont salin entre les deux sous-unités α et β , reproduisait le

phénotype des cellules dépourvues d'ICAP-1 α lorsqu'on s'intéresse à la dynamique des adhérences focales (Millon-Fremillon et al., 2008). De manière surprenante, ce mutant ne reproduit pas le phénotype observé lors de la perte d'ICAP-1 α sur la fibrillogénèse de fibronectine et la minéralisation. L'absence de défaut de fibrillogénèse obtenu avec le mutant D759A est en accord avec la littérature (Czuchra et al., 2006; Sakai et al., 1998). Ainsi, il apparaît clairement que des dynamiques et des mécanismes d'activation des intégrines différents prennent part à ces deux processus et que la transition des adhérences focales en adhérences fibrillaires nécessite des cycles d'activation/désactivation des intégrines et/ou le recrutement de protéines particulières. Alors que la rupture du pont salin, probablement par la fixation de la taline sur le domaine cytoplasmique de l'intégrine β 1, est un évènement important pour la dynamique de formation des adhérences focales, son rôle dans la formation des adhérences fibrillaires semble différent. Ces données sont en accord avec la localisation préférentielle de la taline dans les adhérences focales. Toutefois, une étude publiée récemment montre l'importance de la fixation de la taline sur le domaine NPxY proximal de l'intégrine β 1 pour la formation des adhérences fibrillaires (Margadant et al., 2012). ICAP-1 α étant aussi un compétiteur de la taline sur le domaine cytoplasmique de l'intégrine β 1 (Bouvard et al., 2003), il apparaît évident que la formation des adhérences fibrillaires est un phénomène complexe faisant intervenir de nombreux acteurs et nécessitant des cycles dynamiques d'association/ dissociation de ces différents acteurs. De plus, il est clair que la formation des adhérences fibrillaires, en plus de nécessiter une régulation fine de l'activation/désactivation des intégrines, requiert également le recrutement régulé très finement au niveau spatiotemporel de protéines ayant des actions spécifiques autres que la régulation de l'affinité des intégrines (ex. mise sous tension par la liaison au cytosquelette d'actine...).

Les différents phénotypes obtenus avec les cellules n'exprimant pas ICAP-1 α ou exprimant le mutant D759A de l'intégrine β 1 suggèrent qu'adhérences focales et adhérences fibrillaires sont des structures distinctes avec des dynamiques différentes et faisant intervenir des acteurs moléculaires spécifiques. Nos travaux indiquent que la perte d'ICAP-1 α interfère avec la libération de protéines associées aux intégrines telles que la kindline-2, réduisant ainsi la maturation des adhérences focales en adhérences fibrillaires. Mais d'autres acteurs moléculaires pourraient être également impliqués dans la maturation des adhérences fibrillaires. Il a en effet été montré que le complexe

ILK/PINCH/parvin (IPP) était nécessaire à la formation des adhérences fibrillaires via le recrutement de la tensine et la stabilisation des interactions intégrine/actine (Stanchi et al., 2009). La kindline-2 ayant été identifiée comme un élément déterminant du recrutement de ILK au niveau des adhérences focales chez *C. Elegans* (Mackinnon et al., 2002), on peut imaginer qu'ICAP-1 α , en régulant la dynamique de fixation de la kindline-2 sur l'intégrine β 1, régule par conséquent la dynamique de recrutement de ILK et de la tensine.

D'autres molécules telles que la SHARPIN et la filamine ont été identifiées comme étant des régulateurs négatifs des intégrines (Rantala et al., 2011). La SHARPIN bien que s'associant avec la sous-unité α des intégrines, régule négativement leur affinité en inhibant les liaisons sur la sous-unité β de la taline et de la kindline. La filamine pour sa part lie la sous-unité β des intégrines et serait un compétiteur de la taline (Kiema et al., 2006). Il est à noter que les souris délétées pour l'une ou l'autre de ces protéines présentent toutes deux des phénotypes osseux (Xia et al., 2011; Zhou et al., 2007). Bien que les effets de la perte de la SHARPIN et de la filamine sur la formation des adhérences fibrillaires et l'organisation de la matrice de fibronectine n'aient pas encore été étudiés, on peut imaginer que ces deux molécules, tout comme ICAP-1 α , en régulant l'affinité des intégrines, participent à la fibrillogénèse de fibronectine, processus nécessaire à la formation osseuse.

La formation des adhérences fibrillaires résulte de la translocation des intégrines α 5 β 1 depuis les adhérences focales vers le centre de la cellule en réponse à la contrainte mécanique exercée par le cytosquelette d'actine (Pankov et al., 2000). Il existe donc un équilibre entre adhérences focales et adhérences fibrillaires. En effet, le blocage des intégrines β 1 dans les adhérences focales par la culture des cellules sur une matrice de fibronectine réduit la formation des adhérences fibrillaires (résultats non montrés). A contrario, la culture de cellules sur substrat engageant peu les intégrines β 1 au niveau des adhérences focales promeut la formation des adhérences fibrillaires et l'assemblage de la fibronectine. Les données obtenues avec les mutants d'ICAP-1 α et de l'intégrine β 1 suggèrent donc que la fixation d'ICAP-1 α sur l'intégrine β 1 ainsi que son entrée en compétition avec la kindline-2 favorisent la translocation des intégrines β 1 depuis les adhérences focales vers le centre de la cellule pour former les adhérences fibrillaires. Toutefois, si la formation des adhérences fibrillaires est le résultat de la maturation des

adhérences focales, il semble intéressant de se demander pourquoi la mutation D759A qui induit une modification de la dynamique des adhérences focales n'a pas de répercussion sur les adhérences fibrillaires et la fibrillogénèse de fibronectine.

Peu de données existent encore concernant la régulation de la protéine ICAP-1 α . Une étude très récente a mis en évidence le rôle répresseur de la protéine KRIT1 sur l'action inhibitrice d'ICAP-1 α sur l'intégrine β 1 (Liu et al., 2013). Les auteurs de ces travaux montrent de manière élégante que la protéine KRIT1 est un commutateur pour l'activation des intégrines grâce à son effet antagoniste sur la protéine ICAP-1 α du fait de la compétition entre KRIT1 et l'intégrine β 1 pour le recrutement d'ICAP-1 α . Les souris délétées pour *Krit1* meurent en cours de gestation ce qui ne permet pas d'étudier le rôle de cette protéine dans la formation osseuse (Whitehead et al., 2004). La question se pose donc encore de son implication dans le processus de fibrillogénèse nécessaire à la formation osseuse. Au laboratoire, il a été mis en évidence un autre mécanisme de régulation de la protéine ICAP-1 α impliquant sa phosphorylation. La CamKII en phosphorylant ICAP-1 α au niveau de sa thréonine 38 permet son dépliement et libère son domaine PTB nécessaire à l'interaction avec l'intégrine β 1 (Millon-Fremillon *et al.*, manuscrit en soumission). Cette étude principalement axée sur l'analyse de la dynamique des adhérences focales pose la question du rôle de la CamKII et de la phosphorylation d'ICAP-1 α dans la dynamique des adhérences fibrillaires et l'organisation de la matrice de fibronectine.

La plupart des données obtenues concernant la formation et la dynamique des structures d'adhérences cellulaires l'ont été via des modèles de cultures en deux dimensions. Toutefois, il apparaît maintenant clair que la cellule en plus de répondre à la nature de la matrice, ressent ses propriétés physiques dont sa tridimensionnalité. Il a ainsi été montré que les structures d'adhérences formées dans des matrices tridimensionnelles, ou « adhérences 3D » étaient des adhérences proches dans leur composition des adhérences fibrillaires, constituées principalement d'intégrines α 5 β 1 et contenant de la tensine, mais présentant aussi des caractéristiques des adhérences focales avec la présence entre autres de protéines telles que la paxilline et la vinculine (Yamada et al., 2003). La dynamique de ces adhérences 3D reste encore à élucider, toutefois nous apportons dans cette étude des informations importantes concernant le

rôle joué par la kindline-2 et ICAP-1 α dans la formation et la dynamique de ces structures.

I.3.2. L'organisation de la fibronectine, étape clé de la minéralisation ostéoblastique

Il apparaît aujourd'hui évident que la matrice extracellulaire joue un rôle important dans la régulation de fonctions cellulaires telles que la prolifération, la survie ou encore la différenciation. Ainsi la rigidité ainsi que la nature de la matrice vont pouvoir dicter le devenir cellulaire (Engler et al., 2007). La fibronectine en particulier promeut la survie et la différenciation ostéoblastique (Moursi et al., 1996; Moursi et al., 1997). Notre étude met en évidence le rôle indispensable que joue l'assemblage d'une matrice de fibronectine permissive dans le processus de minéralisation. Il apparaît que l'assemblage de la matrice de fibronectine est un prérequis à la mise en place d'une matrice de collagène de type I, composant majoritaire du tissu osseux. La minéralisation d'une matrice de collagène de type I exogène par les cellules déficientes en ICAP-1 α souligne l'importance de la matrice extracellulaire pour la minéralisation, et met en avant le rôle de d'échafaudage joué par la matrice pour la formation des cristaux d'hydroxyapatite. Toutefois, le faible niveau de minéralisation obtenu dans les gels de collagène exogènes avec les cellules déficientes en ICAP-1 α comparé à celui obtenu avec des cellules sauvages pourrait indiquer un défaut de différenciation et de fonction de ces ostéoblastes. La matrice étant un réservoir pour des molécules de signalisation nécessaires à la différenciation ostéoblastique telles que les BMPs ou les FGFs (Huang et al., 2009), on peut imaginer qu'en plus de réguler structurellement la minéralisation, ICAP-1 α via l'assemblage de la matrice de fibronectine, régule aussi en partie la différenciation ostéoblastique dépendante des facteurs de croissance.

I.3.3. La compaction ostéoblastique, processus dépendant de l'organisation de la matrice de fibronectine

ICAP-1 α interagirait avec ROCK et toutes deux seraient colocalisées avec les intégrines à chaîne β 1 au niveau des "ruffles" membranaires et du lamellipode (Stroeken et al., 2006). Toutefois, nos résultats concernant les rôles respectifs d'ICAP-1 α et de ROCK

dans l'assemblage de la fibronectine montrent clairement que ces deux protéines agissent de manière indépendante, via deux voies distinctes. En effet, l'inhibition de ROCK dans des cellules dépourvues d'ICAP-1 α a un effet additif sur la diminution de l'assemblage de la fibronectine. Ainsi, l'effet d'ICAP-1 α n'est pas dépendant de l'activation de ROCK et de la contractilité cellulaire. A l'inverse, dans le processus de fibrillogenèse et de compaction, l'activation de ROCK n'est pas dépendante d'ICAP-1 α et des intégrines β 1. ROCK pourrait ainsi être activée par d'autres récepteurs à la fibronectine ou au collagène comme les intégrines α v β 3, α v β 5, les syndecans ou encore CD44 comme cela a été suggéré récemment (Huang et al., 2011; Wang et al., 2010). Une autre possibilité concernant l'activation de ROCK indépendante des intégrines β 1 reposerait sur l'engagement des cadhérines et des jonctions cellule-cellule. En effet, il a été suggéré que les cadhérines pouvaient activer la voie Rho-ROCK et la contractilité cellulaire (Kalaji et al., 2012; Nelson et al., 2004). Toutefois, l'activation des cadhérines et le renforcement de l'adhésion intercellulaire sont dépendants de l'activation de la voie Rho-ROCK par les intégrines et de la contractilité (Huveneers et al., 2012; Martinez-Rico et al., 2010). Le rôle des cadhérines en amont ou en aval de la voie Rho-ROCK reste donc encore à déterminer.

L'analyse des données obtenues avec les cellules dépourvues d'intégrines β 1 et de fibronectine, formant seulement de petits agrégats en test de compaction, indique que les cadhérines exprimées par les ostéoblastes ne sont pas suffisantes à une compaction ostéoblastique efficace et seraient plutôt impliquées dans des étapes précoces de ce processus. Toutefois, étant donné le rôle des intégrines et de la contractilité dans le renforcement des jonctions cellule-cellule, on ne peut pas exclure un rôle plus tardif des cadhérines dans le phénomène de compaction. Il a en effet été montré dans un système de compaction d'hépatocytes que les cadhérines jouaient un rôle important dans les dernières étapes de la compaction, permettant ainsi la transition morphologique d'agrégats cellulaires lâches en sphéroïdes compacts (Lin et al., 2006).

I.4. Article: "Osteoblast mineralization requires β 1 integrin / ICAP-1-dependent fibronectin deposition"

Osteoblast mineralization requires $\beta 1$ integrin/ICAP-1–dependent fibronectin deposition

Molly Brunner,^{1,2,3} Angélique Millon-Frémillon,^{1,2,3} Genevieve Chevalier,^{1,2,3} Inaam A. Nakchbandi,^{4,5} Deane Mosher,⁶ Marc R. Block,^{1,2,3} Corinne Albigès-Rizo,^{1,2,3} and Daniel Bouvard^{1,2,3}

¹Equipe 1 Dynamique des Systèmes d'Adhérence et Différenciation Cellulaire, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U823, Institut Albert Bonniot, 38042 Grenoble, Cedex 09, France

²Equipe de Recherche Labellisée, Centre National de la Recherche Scientifique 3148, 38042 Grenoble, Cedex 09, France

³Université Joseph Fourier, 38041 Grenoble, Cedex 09, France

⁴Max Planck Institute of Biochemistry, D-82152 Martinsried, Germany

⁵University of Heidelberg, D-69120 Heidelberg, Germany

⁶School of Medicine and Public Health, University of Wisconsin, Madison, WI 53705

The morphogenetic and differentiation events required for bone formation are orchestrated by diffusible and insoluble factors that are localized within the extracellular matrix. In mice, the deletion of ICAP-1, a modulator of $\beta 1$ integrin activation, leads to severe defects in osteoblast proliferation, differentiation, and mineralization and to a delay in bone formation. Deposition of fibronectin and maturation of fibrillar adhesions, adhesive structures that accompany fibronectin deposition, are impaired upon ICAP-1 loss, as are type I collagen deposition and mineralization. Expression of

$\beta 1$ integrin with a mutated binding site for ICAP-1 recapitulates the ICAP-1–null phenotype. Follow-up experiments demonstrated that ICAP-1 negatively regulates kindlin-2 recruitment onto the $\beta 1$ integrin cytoplasmic domain, whereas an excess of kindlin-2 binding has a deleterious effect on fibrillar adhesion formation. These results suggest that ICAP-1 works in concert with kindlin-2 to control the dynamics of $\beta 1$ integrin–containing fibrillar adhesions and, thereby, regulates fibronectin deposition and osteoblast mineralization.

Introduction

The extracellular matrix controls tissue integrity, function, and differentiation (Rozario and DeSimone, 2010). The proteins and proteoglycans in the extracellular matrix depend largely on the tissue (Manabe et al., 2008). Several matrix proteins, such as fibronectin, laminins, or collagens, mediate cell adhesion and support cell differentiation. In addition to the role of its various components in interacting with cells, the physical properties of the extracellular matrix are of paramount importance in defining cell fate and behavior. For instance, human mesenchymal stem cells (hMSCs) cultured on the matrix of various degrees of stiffness undergo different cell fates so that a compliant matrix drives cells to become neuronal-like, whereas stiffer surfaces trigger differentiation of the hMSC into osteoblasts (Engler et al., 2006). Finally, the extracellular matrix acts as a reservoir for signaling molecules

(Hynes, 2009); this function appears to be particularly important for bone tissue (Ramirez and Rifkin, 2009). Thus, signaling proteins, such as the bone morphogenetic proteins (BMPs) or FGFs, are sequestered by the extracellular matrix in active conformations (Dallas et al., 2005; Fontana et al., 2005). Such sequestration appears to be crucial not only during development but also to coordinate bone resorption and deposition (Matsuo, 2009).

Integrins are the main class of receptors implicated in cell–extracellular matrix interactions (Hynes, 1992). These receptors trigger cell adhesion and transmit outside-in and inside-out signals and, thereby, are involved in numerous cellular functions, such as proliferation, apoptosis, cell fate decision, and extracellular matrix organization (Giancotti and Ruoslahti, 1999). One of the most obvious functions of the extracellular matrix and of cell adhesion receptors is to control developmental

M. Brunner and A. Millon-Frémillon contributed equally to this paper.

Correspondence to Daniel Bouvard: daniel.bouvard@ujf-grenoble.fr; or Corinne Albigès-Rizo: corinne.albiges-rizo@ujf-grenoble.fr

Abbreviations used in this paper: BMP, bone morphogenetic protein; FUD, functional upstream domain; hMSC, human mesenchymal stem cells; ILK, integrin-linked kinase; mRFP, monomeric RFP; ROCK, Rho-associated kinase.

© 2011 Brunner et al. This article is distributed under the terms of an Attribution–Noncommercial–Share Alike–No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms>). After six months it is available under a Creative Commons license (Attribution–Noncommercial–Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

Supplemental Material can be found at:
<http://jcb.rupress.org/content/suppl/2011/07/13/jcb.201007108.DC1.html>

processes. Indeed, the importance of various integrin family members for tissue-specific development or function has been unraveled by the use of genetically modified mice in which specific integrins have been targeted (Bouvard et al., 2001).

Bones are formed by the close interplay between osteoblasts, which are bone matrix-depositing cells, and osteoclasts, which are bone-resorbing cells. The precise function of the different integrins in bone homeostasis is rather puzzling, inasmuch as data reported on osteoblasts are contradictory. Although some in vitro data strongly suggest that $\beta 1$ integrins are critical for osteoblast differentiation and function, the role of $\beta 1$ integrins in vivo is less clear (Moursi et al., 1996; Xiao et al., 1998; Wang et al., 2006; Hamidouche et al., 2009). Cell type-specific Cre-mediated deletion of $\beta 1$ integrin in the osteoblast lineage directed by the 2.3-kb type I collagen promoter leads to minor developmental and functional defects resulting from a defect in mechanotransduction in the osteocytes (Phillips et al., 2008). The minor phenotype suggests either an important compensatory effect from other integrins, such as αv forming heterodimers with other β subunits, or/and an early role of $\beta 1$ integrins that was not revealed because of its late deletion. Similarly, the expression of a dominant-negative form of $\beta 1$ integrin in mature osteoblasts shows only mild effects on bone formation (Zimmerman et al., 2000).

The mild effects of targeting $\beta 1$ integrin in late osteoblast lineage contrast with the phenotypic analysis of *Icap-1* (*Itgb1bp1*^{tm1Ref})-deficient mice. ICAP-1 is a small protein that interacts in a specific manner with the $\beta 1A$ integrin cytoplasmic domain (Chang et al., 1997; Zhang and Hemler, 1999). It negatively regulates talin binding onto $\beta 1$ integrin and, thereby, would be expected to limit integrin activation (Bouvard et al., 2003, 2006, 2007; Millon-Frémillon et al., 2008). Germline deletion of *Icap-1* in a mouse impairs osteoblast differentiation and proliferation in vitro and in vivo. *Icap-1*-deficient osteoblasts display defects of adhesion, compaction, and migration (Bouvard et al., 2007; Millon-Frémillon et al., 2008), which explains, at least partly, the bone phenotype observed in vivo.

In this paper, we provide a molecular explanation of how ICAP-1, likely by direct binding onto $\beta 1$ integrin, affects osteoblast function. We show that fibronectin assembly is controlled by the binding of ICAP-1 to the $\beta 1$ integrin tail and that such binding is required for bone mineralization. Our results reveal the critical role of ICAP-1 in modulating the dynamics of fibrillar adhesions, which are adhesive structures responsible for fibronectin deposition. We demonstrate that the control of matrix assembly by ICAP-1- $\beta 1$ integrin interaction plays an important role in governing essential developmental events, such as osteoblast mineralization. We also provide evidence that ICAP-1 negatively regulates recruitment of kindlin-2 onto the $\beta 1$ integrin cytoplasmic domain and that an excess of kindlin-2 binding has a deleterious effect on fibrillar adhesion formation.

Results

Osteoblast cell compaction depends on fibronectin organization

We previously demonstrated that in vitro bone nodule formation is defective in the absence of the ICAP-1 protein

(Bouvard et al., 2007). Because ICAP-1 interacts with $\beta 1$ integrin (Chang et al., 1997; Zhang and Hemler, 1999; Bouvard et al., 2003) and despite the contradictory data concerning $\beta 1$ integrins and bone formation described in the Introduction, we examined the roles of $\beta 1$ integrins and a major ligand, fibronectin, in osteoblast function. Primary osteoblasts from $\beta 1^{\text{fl/fl}}$ or *Fn*^{fl/fl} mice were immortalized, and the gene of interest was deleted by viral transduction with Cre recombinase. Deletion was confirmed by immunostaining and FACS analysis for $\beta 1$ integrin (Fig. S1) and by Western blotting for fibronectin (Fig. S2 C). The resulting cell lines retained their ability to differentiate into osteoblasts, and the following results were confirmed for at least two separate lines of each (Chiba et al., 1993; Bouvard et al., 2007).

Inasmuch as osteoblast condensation occurs during early differentiation, we asked whether $\beta 1$ integrins were required in this process (Hall and Miyake, 2000), especially because ICAP-1 loss leads to abnormal compaction at 24 h (Fig. 1 A; Bouvard et al., 2007). $\beta 1^{-/-}$ cells were unable to form spheroids, in contrast to wild-type or rescue cells (Fig. 1 B), and instead, they formed only small aggregates, presumably because of the presence of cadherins that mediated cell-cell adhesions (Stains and Civitelli, 2005). Because $\alpha 5\beta 1$ integrin has been shown to be critical for fibronectin deposition and organization (Hynes et al., 1992), we therefore examined whether the defect in osteoblast compaction could result from a defect in fibronectin deposition. For this purpose, we analyzed osteoblasts lacking fibronectin. These fibronectin-null cells were unable to form spheroids, in contrast to the wild type (Fig. 1 C). Thus, cell compaction requires both $\beta 1$ integrins and their extracellular ligand fibronectin. Fibronectin might either activate specific signals or provide an extracellular scaffold that allows cell compaction. To distinguish these two possibilities, we used a 49-residue peptide called functional upstream domain (FUD) that has been shown to bind to multiple N-terminal type I modules of fibronectin and, thereby, inhibit assembly of fibronectin into an insoluble matrix (Ensenberger et al., 2001, 2004; Tomasini-Johansson et al., 2001; Zhou et al., 2008; Maurer et al., 2010). Treating the osteoblasts with FUD resulted in abnormal compaction, suggesting that fibronectin deposition is required for compaction to proceed normally (Fig. 1 C). FUD treatment neither alters cell shape nor proliferation, and therefore, adhesion mediated by $\beta 1$ integrins was presumably not affected (Fig. S2). To confirm the key role of fibronectin fibrillogenesis in mediating $\beta 1$ integrin effects on osteoblast compaction, we inhibited fibrillogenesis by using a Rho-associated kinase (ROCK) inhibitor. RhoA/ROCK act downstream of $\alpha 5\beta 1$ and mediate cell contractility required during compaction and for fibronectin fibrillogenesis (Zhong et al., 1998; Yoneda et al., 2007). Confirming previous data, the inhibition of ROCK reduced the insoluble fraction of fibronectin and hence the deposition of fibronectin in the extracellular matrix (Fig. 1 D; Schwarzbauer, 1991; Zhong et al., 1998). ROCK inhibition also reduced osteoblast compaction (Fig. 1 D). It has been proposed that ICAP-1 might be involved in ROCK membrane targeting in myoblasts (Stroeken et al., 2006). We therefore wondered whether the effect of ICAP-1 on osteoblast compaction could be caused by inefficient ROCK signaling.

Icap-1-deficient cells were treated with the ROCK inhibitor Y27632, and both fibronectin deposition and cell compaction were analyzed. As shown in Fig. 1 D, inhibition of ROCK in *Icap-1*-deficient cells further blocked fibronectin assembly relative to ROCK inhibition alone or to ICAP-1-deficient cells, which shows an additive effect. This finding suggests that ROCK and ICAP-1 do not belong to the same linear signaling pathway but rather to separate pathways. In summary, our data show that $\beta 1$ integrin, ICAP-1, and fibronectin are required for osteoblast compaction and suggest that $\beta 1$ integrin effects on compaction are mediated by its ability to modulate fibronectin assembly.

Icap-1 loss reduces fibronectin deposition

The nodule formation assays for osteoblast function were performed in 3D cultures. To determine whether a fibronectin defect could be extended to 2D cultures that would be suited for multiprobe fluorescence microscopy, the experiments were repeated using cells seeded on plates. We investigated whether matrix-associated fibronectin deposition could be perturbed by the loss of ICAP-1. Indeed, both wild-type and rescue cells displayed a larger fraction of matrix-associated insoluble fibronectin than *Icap-1*-null osteoblasts (insoluble to soluble ratio in control cells: 1.3 ± 0.2 vs. 0.7 ± 0.2 in *Icap-1*-deficient cells; $P < 0.001$; Fig. 2, A and B). Immunolabeling of fibronectin on cultured cells showed that most of the cells in *Icap-1*-null cultures were associated with punctate deposits of fibronectin, whereas most of the ICAP-1-expressing cells were associated with dense deposits of fibronectin (Fig. 2 C). Similar results were obtained on spheroids cultures, showing that the fibronectin fibrillogenesis defect was not restricted to 2D culture conditions (Fig. S3, A–C). Importantly, there was no reduction in fibronectin expression and secretion in *Icap-1*-deficient cells as measured by quantitative PCR and Western blotting. Indeed, fibronectin mRNA expression and fibronectin secreted to medium were increased when ICAP-1 was lost (Fig. S3 D). Thus, the defect in fibronectin assembly observed in *Icap-1*-null cells was not caused by a decrease in fibronectin expression or secretion.

Direct $\beta 1$ integrin-*Icap-1* interaction controls fibronectin assembly by osteoblasts

We previously reported that ICAP-1 regulates $\beta 1$ integrin function by reducing its affinity, likely by impairing talin recruitment (Bouvard et al., 2003; Millon-Frémillon et al., 2008). To determine whether ICAP-1-mediated down-regulation of $\beta 1$ integrin affinity is involved in fibronectin fibrillogenesis, we generated various point mutations in the human $\beta 1$ integrin cytoplasmic domain that have been reported to interfere with specific functions. One of those is the mutation at valine 787, which is important for ICAP-1 binding on $\beta 1$ integrin (Chang et al., 2002). To minimize a potential side effect of this mutation on the recruitment of other molecules, such as kindlins, we generated a mutated $\beta 1$ in which valine 787 was replaced by a threonine. This point mutation mimics the membrane-distal part of the $\beta 2$ integrin cytoplasmic tail that does not bind ICAP-1 despite its high similarity with $\beta 1$ integrin while still binding other proteins, such as kindlins (Chang et al., 2002; Moser et al., 2009).

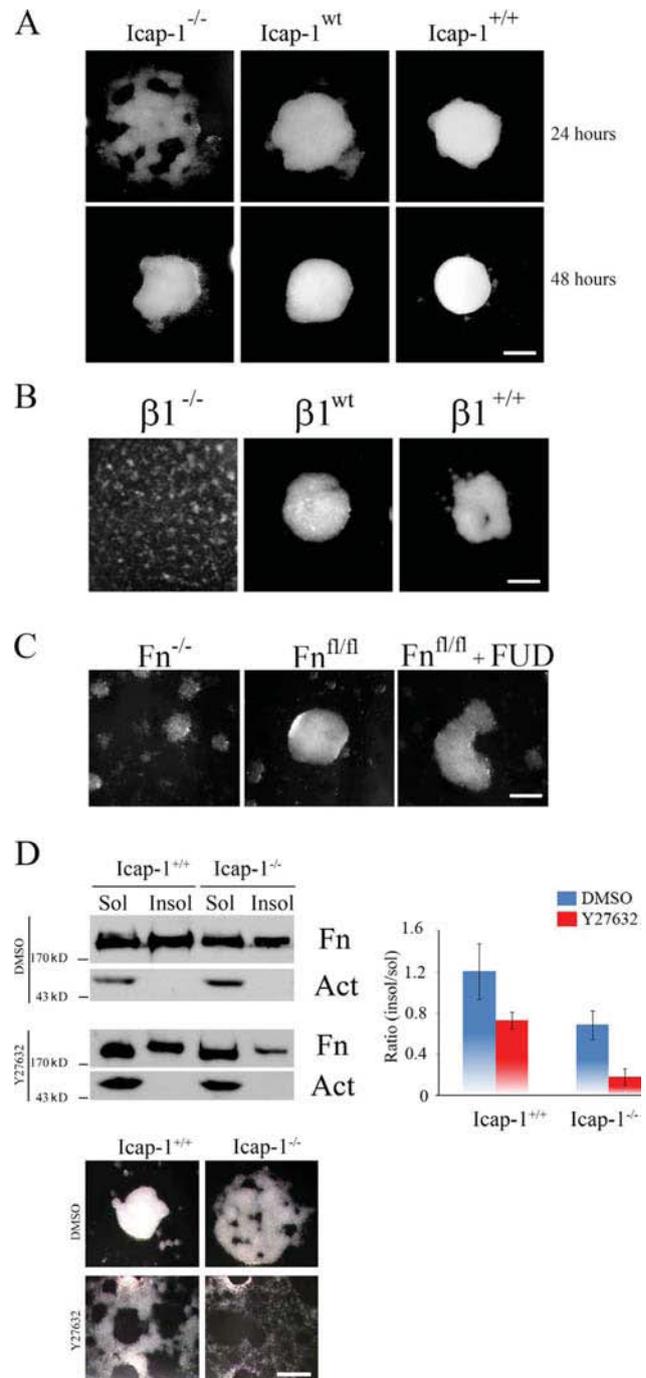


Figure 1. Cell matrix interaction and contractility are required for osteoblast compaction. (A) Cellular compaction of *Icap-1*^{+/+} (wild type), *Icap-1*^{wt} (rescue), and *Icap-1*^{-/-} osteoblasts after 24 or 48 h. (B) Cellular compaction of $\beta 1$ ^{fl/fl} (wild type), $\beta 1$ ^{wt} (rescue), and $\beta 1$ ^{-/-} osteoblasts after 24 h. (C) Cellular compaction after 24 h of *Fn*^{-/-} osteoblasts and *Fn*^{fl/fl} (wild type) treated or not treated with 100 ng/ml FUD. (D) ROCK and ICAP-1 additive control of cell compaction and fibronectin deposition. (top) Fibronectin deposition was monitored in *Icap-1*^{+/+} (wild type) and *Icap-1*^{-/-} osteoblasts treated with DMSO (control) or ROCK inhibitor (Y27632). (left) Fibronectin amounts (Fn) were estimated by Western blotting, and the protein load was normalized using actin (Act). (right) Quantification of fibronectin deposition shown as the means and SDs from three independent experiments using ImageJ software. (bottom) Cell compaction of *Icap-1*^{+/+} (wild type) and *Icap-1*^{-/-} in presence of DMSO (control) or ROCK inhibitor (Y27632) were imaged after 24 h. Sol, soluble; Insol, insoluble. Bars, 1 mm.

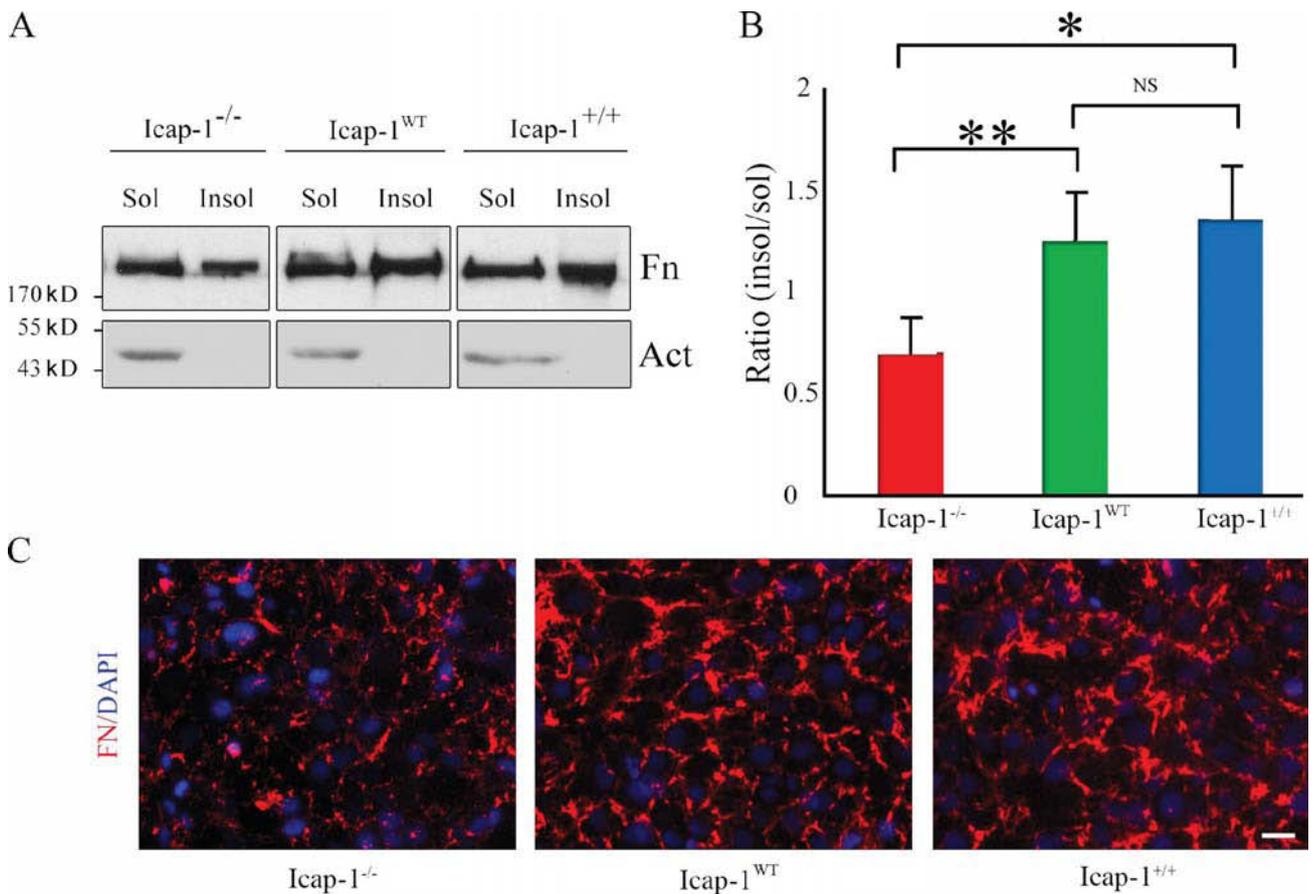


Figure 2. *Icap-1^{-/-}* osteoblasts in 2D culture exhibit a defect in fibronectin deposition. (A) *Icap-1^{+/+}* (wild type), *Icap-1^{WT}* (rescue), and *Icap-1^{-/-}* cells were cultured for 3 d and then lysed in a buffer containing deoxycholate to separate the insoluble matrix-bound fibronectin (Insol) from the soluble fibronectin (Sol). Fibronectin (Fn) amounts were estimated by Western blotting, and the protein load was normalized using actin (Act). (B) Quantification of 10 independent experiments using ImageJ software. Quantifications are shown as the means and SDs of the ratio of insoluble/soluble fibronectin fraction (a single and a double asterisk show a significant difference with $P = 0.001$ and 0.0004 , respectively; NS, no significant difference with $P = 0.3$). (C) Fibronectin deposition of *Icap-1^{-/-}*, *Icap-1^{WT}* (rescue), and *Icap-1^{+/+}* (wild type) cells in 2D culture. Cells were fixed and immunostained for fibronectin and counterstained with DAPI. Bar, 20 μm.

The V787T mutation resulted in decreased ICAP-1 binding to $\beta 1$ integrin without interfering with the binding of kindlin-2 and talin head (Fig. S4). The $\beta 1^{V787T}$ integrin mutant was introduced into $\beta 1$ -null osteoblasts, and positive cells were selected by FACS based on human $\beta 1$ expression (Fig. S1 A). Compared with control cells, osteoblasts expressing the $\beta 1^{V787T}$ integrin showed a significant decrease in insoluble matrix-bound fibronectin (Fig. 3, A and B). In line with this observation, fibronectin immunofluorescent staining in confluent cultures of $\beta 1^{V787T}$ cells revealed less fibronectin deposition than in control cells (Fig. 3 C). Altogether, the defect in fibronectin fibrillogenesis observed in both *Icap-1*-null cells and $\beta 1^{V787T}$ cells strongly suggests that efficient fibronectin fibrillogenesis requires the direct binding of ICAP-1 onto the $\beta 1$ integrin cytoplasmic tail.

The introduction of D759A point mutation into $\beta 1$ integrin (known to trigger a preactivation state; Hughes et al., 1996; Sakai et al., 1998) reproduced the effect of the lack of ICAP-1 on focal adhesion dynamics (Millon-Frémillon et al., 2008). We therefore asked whether this mutation also alters fibronectin fibrillogenesis. In line with previous results with fibroblasts (Sakai et al., 1998), $\beta 1^{D759A}$ osteoblasts did not reduce fibronectin

deposition significantly (Fig. 3). Next, we wondered whether the fibronectin fibrillogenesis defect observed in *Icap-1*-null cells was associated with altered fibronectin reorganization. Wild-type, rescue, and *Icap-1*-null osteoblasts were seeded on a fibronectin coat, cultured for 3 h, fixed, and double stained for fibronectin and $\beta 1$ integrin to visualize the capability of the cells to reorganize the surrounding extracellular matrix (Fig. 4). Whereas wild-type and rescue cells reorganized the fibronectin coating into fibrils that partially co-distributed with fibrillar arrays of $\beta 1$ integrins, only minimal redistribution of fibronectin or fibrillar arrays of integrins were observed with *Icap-1*-null osteoblasts (Fig. 4 A). Treatment of wild-type cells with the FUD peptide also blocked fibronectin redistribution in this assay (Fig. 4 B). These findings suggest that ICAP-1 controls fibrillar adhesion dynamics, which in turn, leads to fibronectin matrix reorganization.

Fibrillar adhesion dynamics are impaired in *Icap-1*-null cells

Based on the evidence that ICAP-1 is likely required for fibronectin fibrillogenesis via its direct binding onto $\beta 1$ integrin

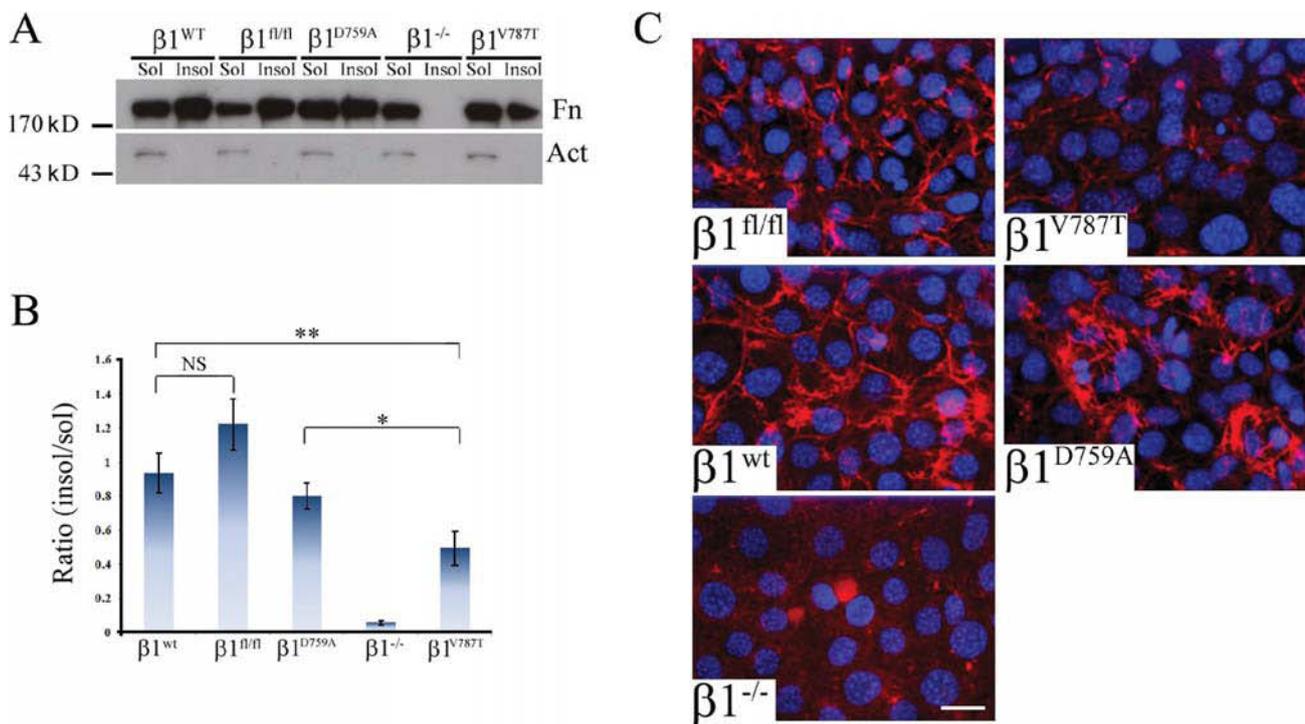


Figure 3. Fibronectin fibrillogenesis requires $\beta 1$ integrin in an ICAP-1-dependent manner. (A) $\beta 1^{fl/fl}$ (wild type), $\beta 1^{WT}$ (rescue), $\beta 1^{D759A}$, $\beta 1^{-/-}$, and $\beta 1^{V787T}$ cells were cultured for 3 d and then lysed in a buffer containing deoxycholate to separate the insoluble matrix-bound fibronectin (Insol) from the soluble fibronectin (Sol). Fibronectin (Fn) amounts were estimated by Western blotting, and the protein load was normalized using actin (Act). (B) Quantification of four independent experiments using ImageJ software. Quantifications are shown as means and SDs of ratio of insoluble/soluble fibronectin fraction (a double and single asterisk shows a significant difference with $P = 0.001$ and 0.015 , respectively; NS, no significant difference with a $P = 0.18$). (C) $\beta 1^{WT}$ (rescue), $\beta 1^{fl/fl}$ (wild type), $\beta 1^{D759A}$, $\beta 1^{-/-}$, and $\beta 1^{V787T}$ cells were fixed and immunostained for fibronectin and counterstained with DAPI. Bar, 10 μm .

and modulation of movement of $\beta 1$ integrins into fibrillar adhesions, we further analyzed the molecular organization of adhesive structures. Thus, we immunostained cultured cells for fibronectin, talin, and $\beta 1$ (Fig. 5). As shown in previous experiments, *Icap-1*-deficient osteoblasts exhibited reduced staining for fibronectin (Fig. 5 A). Talin staining in wild-type and *Icap-1*-null cells was located at the periphery of both cells but in thinner and more elongated streaks in mutant cells than in control cells (Fig. 5 B). Thus, in wild-type cells, talin appears to preferentially remain within focal adhesions rather than following fibrillar adhesions. When talin and $\beta 1$ integrin were costained in wild-type cells, talin was concentrated at the cell periphery, whereas $\beta 1$ integrin displayed a different distribution pattern with extended streaks originating from the cell edge and pointing to the cell center. Costaining of *Icap-1*-null cells demonstrated colocalization of talin and $\beta 1$ integrin throughout the length of the streaks. Image analysis corroborated that talin and $\beta 1$ integrin distribution patterns were different in *Icap-1*-null and wild-type cells (Fig. 5 C). Thus, in *Icap-1*-deficient cells, talin and $\beta 1$ integrin colocalized in adhesive structures, suggesting that $\beta 1$ integrins are not translocated normally into fibrillar adhesions, or fibrillar adhesion formation is somehow otherwise impaired.

To analyze fibrillar adhesion dynamics further, we generated *Icap-1*-deficient and wild-type cells expressing monomeric RFP (mRFP)-tagged tensin, a marker of fibrillar adhesions (Zamir et al., 1999). We took advantage of the dual localization

of tensin to focal and fibrillar adhesions to follow its translocation from one structure to another. Both control and *Icap-1*-deficient cells were seeded on fibronectin-coated glass coverslips in the absence of serum, resulting in tensin localization at peripheral focal adhesions (Fig. 6 A). After 1 h of adhesion, the serum-free medium was replaced by serum-containing complete medium to increase cell contractility and enable fibronectin fibrillogenesis (Zhang et al., 1994). After 4 h, the cells were fixed, and mRFP fluorescence was analyzed to localize tensin. As shown in Fig. 6 A, at time 0, tensin was concentrated at the cell periphery in all genotypes. After addition of complete medium to wild-type and rescue cells, tensin moved centrally, conversely to *Icap-1*-null cells in which tensin remained at the cell edges (Fig. 6 A). The apparent perturbation of tensin dynamics upon ICAP-1 loss was confirmed using time-lapse video microscopy of wild-type and *Icap-1*-null cells expressing mRFP-tensin that were seeded on glass coverslips in complete medium (Fig. 6 B). As expected, in wild-type cells, time course analysis of mRFP-tensin localization showed translocation from the cell edge to cell center (Zamir et al., 1999). In contrast, in *Icap-1*-null osteoblasts, tensin translocation was not directionally oriented toward the cell center, but rather the protein kept a static localization (Fig. 6 B). This defect in fibrillar adhesion formation was further confirmed using a $\beta 1$ integrin antibody in the pulse-chase experiment (Fig. S5; Pankov et al., 2000). Although control cells displayed clear $\beta 1$ integrin translocation from peripheral focal adhesions sites to fibrillar adhesions, *Icap-1*-deficient cells

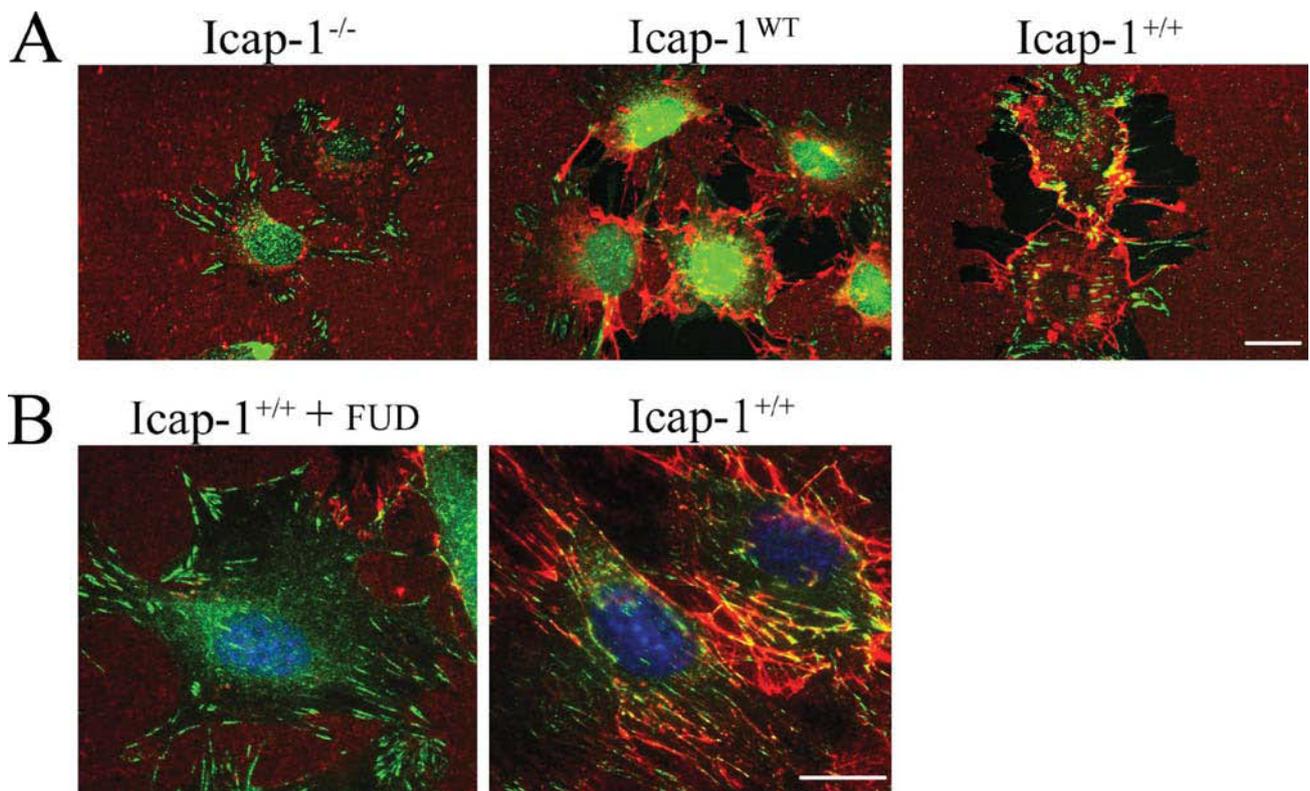


Figure 4. **Fibronectin reorganization depends on *Icap-1* and its ability to self-assemble.** (A) *Icap-1*^{+/+} (wild type), *Icap-1*^{WT} (rescue), and *Icap-1*^{-/-} cells were seeded on fibronectin-coated coverslips. After 4 h of incubation, cells were fixed and immunostained for $\beta 1$ integrin (green) and for total fibronectin (red). (B) Wild-type cells were seeded on fibronectin in the absence or presence of FUD (*Icap-1*^{+/+} +FUD). After 4 h of incubation, cells were fixed and immunostained for $\beta 1$ integrin (green) and for total fibronectin (red). Bars, 10 μ m.

displayed only faint $\beta 1$ staining close to the cell edge, suggesting a profound perturbation of $\beta 1$ dynamics. These results all indicate that ICAP-1 has an important role in the dynamics of fibrillar adhesions and provide a reasonable explanation for the fibronectin deposition defect observed in *Icap-1*-deficient cells.

***Icap-1* regulates recruitment of kindlin-2 on the $\beta 1$ integrin cytoplasmic domain**

ICAP-1 and kindlins interact with an overlapping binding site on the cytoplasmic domain of $\beta 1$ integrin (Chang et al., 1997; Zhang and Hemler, 1999; Larjava et al., 2008; Ma et al., 2008; Montanez et al., 2008; Meves et al., 2009). Therefore, we addressed the potential effect of ICAP-1 in the regulation of kindlin-2 binding on $\beta 1$ integrin. First, we made use of *Icap-1*-deficient cells and the $\beta 1$ ^{V787T} integrin mutant to analyze whether loss of ICAP-1 binding on $\beta 1$ integrin could affect kindlin-2 localization. $\beta 1$ ^{fl/fl}, *Icap-1*^{-/-}, and $\beta 1$ ^{V787T} were transduced with EGFP-kindlin-2 retrovirus to generate cell lines. Based on EGFP expression, clones were selected for their expression level (Fig. S4 and not depicted). Interestingly, high expression of EGFP-kindlin-2 was achieved readily in control cells but always low in *Icap-1*-deficient cells as well as in $\beta 1$ ^{V787T} mutant cells, already suggesting a molecular interaction. Kindlin-2 localization in focal adhesions was easily detectable in $\beta 1$ ^{V787T} and *Icap-1*-deficient cells, whereas control cells displayed faint staining, mainly at the cell edge (Fig. 7 A). Increasing the expression of kindlin-2 in control cells was associated with

a greater localization at focal adhesion sites (unpublished data). This observation suggested that ICAP-1 negatively regulates kindlin-2 localization within focal adhesions. To address the role of ICAP-1 in regulating kindlin-2 binding on $\beta 1$ integrin cytoplasmic domain more directly, we expressed ICAP-1 in HEK 293 cells and analyzed whether ICAP-1 modulates the interaction of kindlin-2 with the GST- $\beta 1$ fusion protein in a pull-down assay. ICAP-1 overexpression significantly reduced the amount of kindlin-2 in GST- $\beta 1$ pull-down assays, again arguing that ICAP-1 negatively regulates kindlin-2 binding on $\beta 1$ integrin (Fig. 7 B).

To explore whether part of the *Icap-1*-null phenotype is caused by an excess of kindlin-2 binding onto $\beta 1$ integrin, we selected an osteoblast cell line in which kindlin-2 expression was maximal (Fig. S4) and used it to see whether fibronectin fibrillogenesis proceeded correctly. Such overexpression of kindlin-2 dramatically reduced fibronectin deposition, relative to nontransfected cells (Fig. 7 C).

Matrix-associated fibronectin controls osteoblast mineralization

We previously reported that *Icap-1*-null mice exhibit decreased osteoblast proliferation, differentiation, and mineralization, resulting in a distinct bone phenotype (Bouvard et al., 2007). On the other hand, fibronectin has been shown to be crucial for osteoblast differentiation and survival in vitro and in vivo (Moursi et al., 1996, 1997; Bentmann et al., 2010). We therefore examined

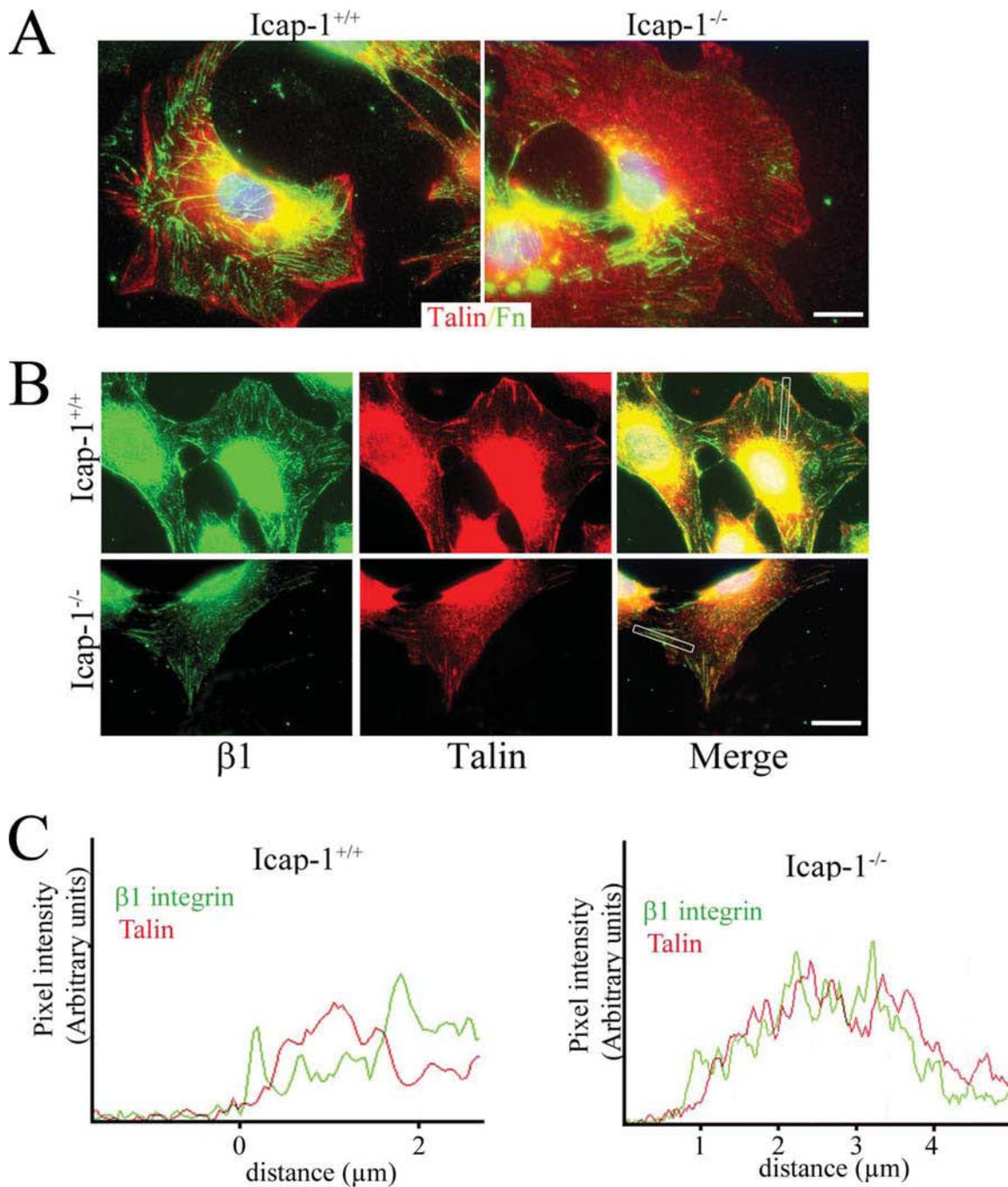


Figure 5. **Fibrillar adhesion formation is defective in *Icap-1*^{-/-} osteoblasts.** (A) *Icap-1*^{+/+} (wild type) or *Icap-1*^{-/-} osteoblasts were seeded on fibronectin-coated coverslips in complete medium. After overnight incubation, the cells were fixed and immunostained for talin and fibronectin (Fn) and counterstained with DAPI (blue). (B) Immunostaining of talin (red) and $\beta 1$ integrin (green) counterstained with DAPI (blue) of *Icap-1*^{+/+} (wild type) or *Icap-1*^{-/-} osteoblasts. A typical area used for pixel plot analysis is boxed. (C) Pixel intensity profile along focal adhesion for talin and $\beta 1$ integrin is represented from cell edge to cell center. These plots are representative of ≥ 10 different plots analyzed. Bars, 10 μm .

whether the mineralization defect of *Icap-1*-null osteoblasts might be caused by the aforementioned defect in fibronectin fibrillogenesis. For this, we monitored the in vitro mineralization capabilities of osteoblasts expressing $\beta 1^{\text{fl/fl}}$ (wild type), $\beta 1^{-/-}$, $\beta 1^{\text{WT}}$ (rescue), $\beta 1^{\text{D759A}}$, and $\beta 1^{\text{V787T}}$. As expected, the induction of differentiation of wild-type and rescue $\beta 1$ osteoblasts resulted in the appearance of mineralized bone nodules, revealed by Alizarin red S staining

at day 20 (Fig. 8, arrowheads). We also observed mineralization with the $\beta 1^{\text{D759A}}$ mutant (Fig. 8, arrowheads), which agrees with the fact that this point mutation does not impair fibronectin deposition (Fig. 3). Although the color uptake varied depending on the speed of mineralization, we constantly observed bone nodules when osteoblasts expressing $\beta 1^{\text{fl/fl}}$ (rescue), $\beta 1^{\text{WT}}$, and $\beta 1^{\text{D759A}}$ were used, in sharp contrast to osteoblasts expressing $\beta 1^{-/-}$ and

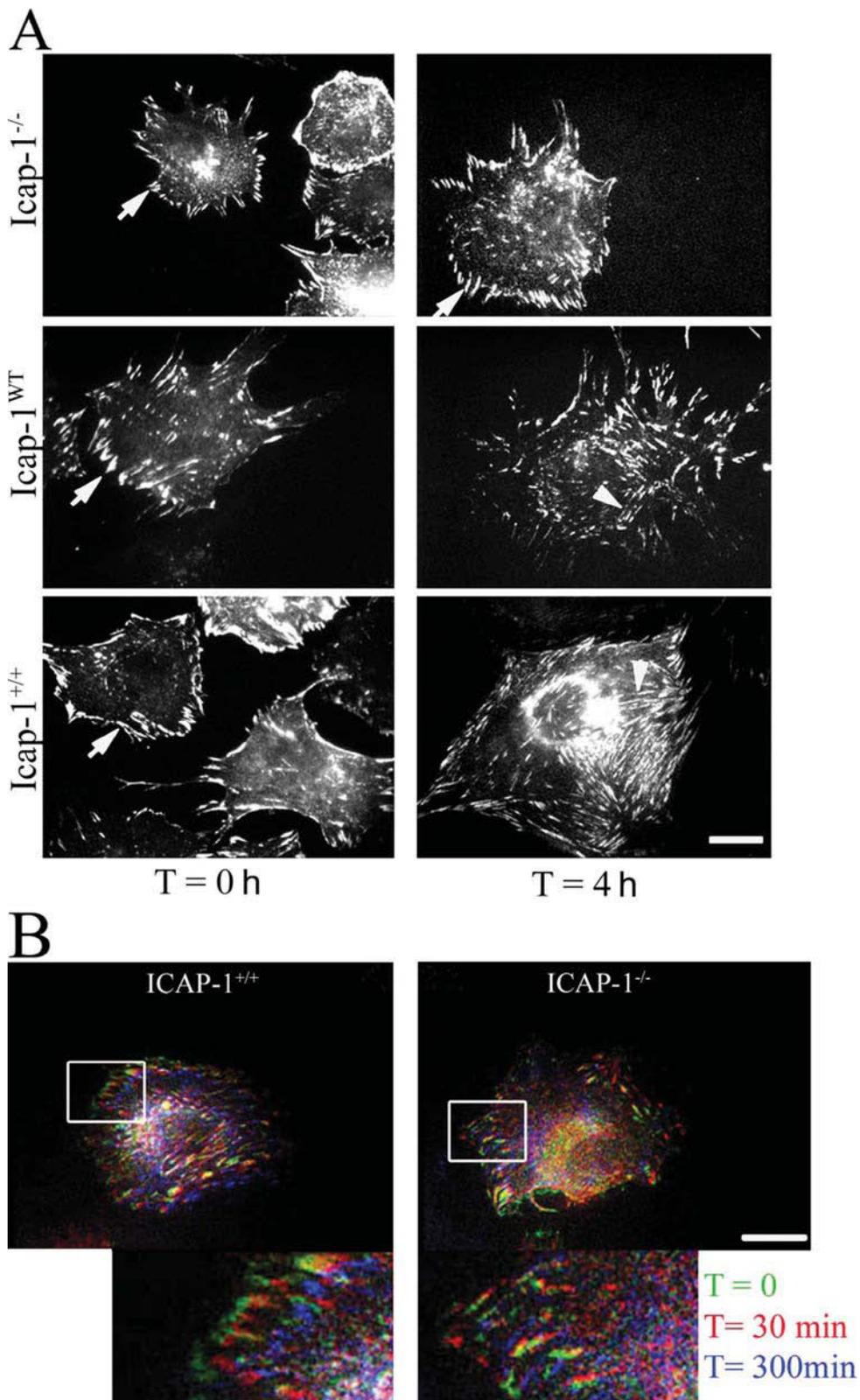


Figure 6. **Tensin dynamics are impaired in *Icap-1^{-/-}* osteoblasts.** (A) Localization of mRFP-tensin in *Icap-1^{+/+}* (wild type), *Icap-1^{WT}* (rescue), and *Icap-1^{-/-}* cells in the absence (T = 0 h) or presence (T = 4 h) of serum. Arrows indicate peripheral focal adhesions; the arrowhead indicates dorsal fibrillar adhesions. (B) Time-lapse video microscopy of mRFP-tensin in *Icap-1^{+/+}* (wild type) and *Icap-1^{-/-}* osteoblasts seeded on glass coverslips. Frames at time 0, 30, and 300 min were extracted from a representative video and arbitrarily colored in green, red, and blue. The boxed areas in the top images are shown at higher magnifications below. Bars, 10 μ m.

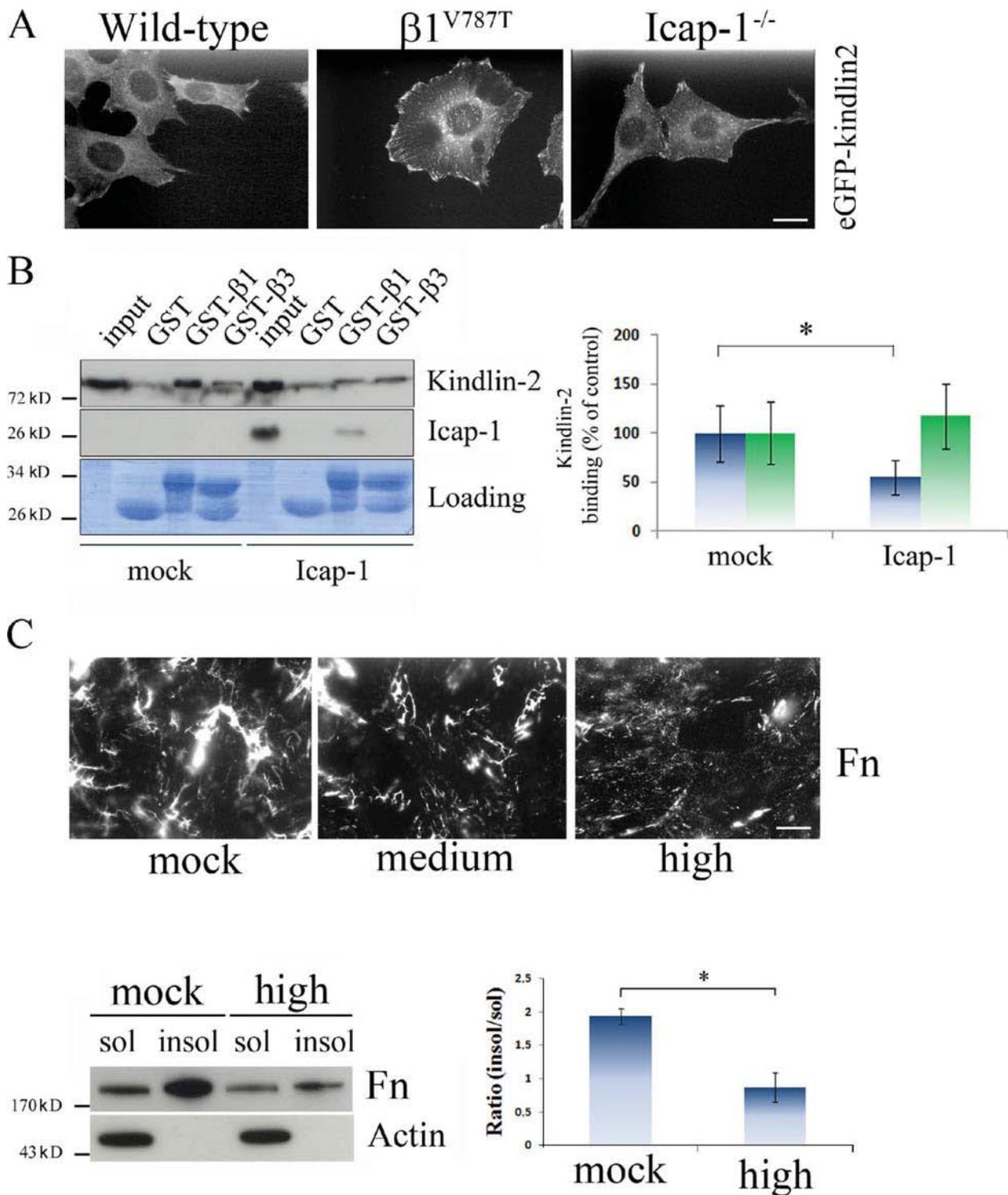


Figure 7. ICAP-1 regulates fibrillogenesis by negatively regulating kindlin-2 binding on $\beta 1$ integrin. (A) EGFP-kindlin-2 localization in wild-type, $\beta 1^{V787T}$, or *Icap-1*^{-/-} cells seeded overnight on glass coverslips. (B) Kindlin-2 binding on $\beta 1$ integrin in the presence of a normal (mock) or high level of ICAP-1 (*Icap-1*) was analyzed using pull-down assays. Kindlin-2 binding on GST alone, GST- $\beta 1$, and GST- $\beta 3$ as well as ICAP-1 expression was visualized by Western blotting, and kindlin-2 bindings to GST- $\beta 1$ (blue) and GST- $\beta 3$ (green) were quantified using ImageJ software and shown as the means and SDs of six independent experiments (asterisk indicates a significant difference with $P = 0.05$). (C) Visualization of fibronectin (Fn) deposition in cells expressing different levels of EGFP-kindlin-2 (from nontransfected cells [mock], moderate [medium], and high level [high]). Fibronectin deposition was visualized by immunofluorescence (top) or after biochemical fractionation to determine the relative quantity of matrix-bound fibronectin (insol) and the nonorganized counterparts (sol; bottom). Data are the means and SDs representatives of three different experiments performed with two different clones (the asterisk indicates a significant difference with $P = 0.0009$). Bars, 10 μm .

$\beta 1^{V787T}$, which were unable to form mineralized bone nodules despite their ability to express alkaline phosphatase, an early marker of osteoblast commitment (Fig. 8). Interestingly, osteoblasts expressing $\beta 1^{-/-}$ and $\beta 1^{V787T}$ also displayed a fibronectin deposition defect, similar to that of *Icap-1*-null osteoblasts (Figs. 2 and 3). These observations suggest that fibronectin organization is crucial for osteoblast mineralization. To test by a second approach whether fibronectin organization is required for proper mineralization, we blocked fibronectin assembly in wild-type cells by FUD and followed mineralization. In contrast to untreated wild-type cells, which displayed extensive mineralization, FUD-treated cells showed a significant reduction in mineralization (Fig. 9 A). Again, as we observed for cells with altered $\beta 1$ integrin, the expression of alkaline phosphatase was still detectable, showing that treated cells have retained their capacity to commit to osteoblasts. Together, these data indicate that fibronectin organization is crucial for osteoblast mineralization.

We next considered how fibronectin influences mineralization and hypothesized that fibronectin directs deposition of other molecules to support mineralization. Because fibronectin directly binds to type I collagen and is important for its deposition, we immunostained for type I collagen control (wild type), *Icap-1*^{-/-}, or $\beta 1^{-/-}$ osteoblasts during their differentiation (Fig. 9 B). In contrast to controls that clearly showed a significant and reproducible increase in collagen immunoreactivity after differentiation, *Icap-1*- as well as $\beta 1$ -deficient cells did not increase their amount of type I collagen. Very similar results were obtained when control cells were treated with FUD (unpublished data). These results show that fibronectin is an important regulator of type I collagen deposition by osteoblasts. To relate the lack of mineralization in cultures of mutant cells with the absence of a “mineralizable” matrix, we seeded control, *Icap-1*-, and $\beta 1$ -deficient cells in gels containing a high concentration of collagen. Induction of differentiation led to mineralization in both control and *Icap-1*-deficient osteoblasts, although to a much lower extent in *Icap-1*-null osteoblasts (Fig. 9 C). $\beta 1$ integrin-deficient osteoblasts also displayed mineralization but to a much lower extent than control cells, likely reflecting their profound defect in proliferation (Fig. 9 C). Therefore, by providing an appropriate matrix, *Icap-1*^{-/-} cells were able to mineralize, demonstrating that in vitro, the absence of mineralization is primarily caused by an altered matrix.

Because the effect of a lack of ICAP-1 on fibronectin deposition could be reproduced by kindlin-2 overexpression, we asked whether this phenocopy could be extended to the mineralization defect. Indeed, overexpression of kindlin-2 strongly repressed mineralization, supporting our previous findings (Fig. 9 D). Altogether, these data highlight a novel important function of ICAP-1 in regulating kindlin-2 recruitment on $\beta 1$ integrin and the subsequent extracellular matrix organization.

Discussion

Icap-1 regulates fibronectin assembly in a $\beta 1$ integrin-dependent manner

The experiments described herein define a new role for ICAP-1 in facilitating fibronectin fibrillogenesis. Our investigations

explain why germline deletion of *Icap-1* in mice impairs osteoblast differentiation and proliferation in vitro and in vivo and why *Icap-1*-deficient osteoblasts display defects of adhesion, compaction, and migration.

Building on our previous study demonstrating increased assembly of focal adhesions in the absence of ICAP-1 (Millon-Frémillon et al., 2008), we show here that loss of ICAP-1 perturbs the maturation of focal adhesions into fibrillar adhesions. Interestingly, expressing preactivated integrin bearing mutation D759A reproduced the altered dynamics of focal adhesions seen in *Icap-1*-null cells but not the reduced fibronectin fibrillogenesis. Reconciling this apparent discrepancy calls for more extensive work, but it is likely that the transition of focal adhesions to fibrillar adhesions requires cycling and/or recruitment of critical proteins. Supporting this view is the distribution of talin, which is more concentrated in focal adhesions than in fibrillar adhesions. Conversely, tensin is almost absent from focal adhesions (for cells cultured in complete medium) but enriched in fibrillar adhesions. Thus, one can easily envision that focal and fibrillar adhesion dynamics, formation, or initiation might be differentially regulated. In such a model, the importance of the salt bridge of α and $\beta 1$ integrin cytoplasmic tails might be more important in one context than the other. Talin, which has been reported to disrupt the salt bridge (Anthis et al., 2009), is more concentrated in focal adhesions. The salt bridge disruption may be less important for the dynamics of fibrillar adhesions, which contain little talin, and may be, instead, controlled by other tail-effector interactions. In any case, our findings are consistent with the absence of an obvious phenotype in a knockin mouse model expressing the D759A mutation (Czuchra et al., 2006).

The effect of ICAP-1 on the cell ability to assemble fibronectin fibers was likely dependent on the direct interaction between ICAP-1 and the $\beta 1$ integrin chain, as ascertained by the finding that expression of mutated $\beta 1$ integrin with reduced ICAP-1 affinity recapitulates both defects: i.e., the lack of fibronectin assembly and mineralization defect. Furthermore, we provide evidence that ICAP-1 plays an important role in regulating the recruitment of $\beta 1$ integrins to fibrillar adhesions and, thereby, the dynamics of fibrillar adhesions.

These results support the view that fibrillar adhesions and focal adhesions are distinct structures with specific composition and dynamics (Cukierman et al., 2001; Green et al., 2009). In addition, the two adhesion types support different functions of $\beta 1$ integrins: focal adhesions for cell adhesion and fibrillar adhesions for deposition and organization of the extracellular matrix. How these structures are related is an open question. Locking integrin affinity would be expected to cause defects in spreading and migration mediated by focal adhesions or in extracellular matrix organization mediated by fibrillar adhesions. One interesting observation is the segregation of $\beta 1$ integrins in either focal adhesions or fibrillar adhesions depending on the cellular context. We always observed formation of fibrillar adhesion sites when cells were cultured on an uncoated substrate. Conversely, forcing $\beta 1$ integrin into focal adhesions by seeding cells on concentrated fibronectin-coated surfaces or blocking fibronectin assembly was associated with reduced fibrillar adhesions but

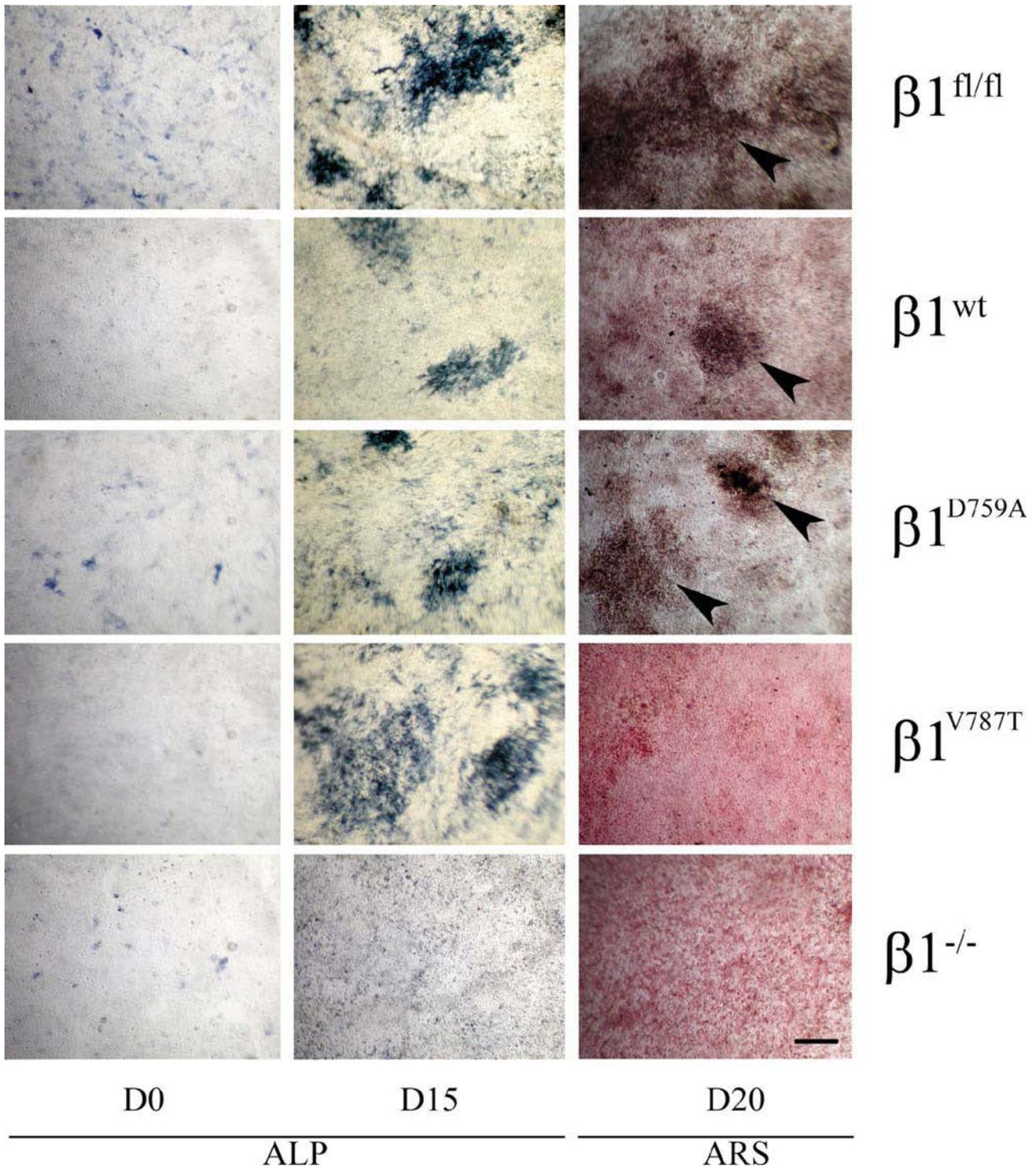


Figure 8. **$\beta 1$ integrin regulates in vitro mineralization in an *Icap-1*-dependent manner.** $\beta 1^{fl/fl}$ (wild type), $\beta 1^{wt}$ (rescue), $\beta 1^{D759A}$, $\beta 1^{V787T}$, and $\beta 1^{-/-}$ cells were induced to differentiate into osteoblasts. Expression of alkaline phosphatase (ALP) was used to follow the early commitment of cells to the osteoblast lineage at day 0 (D0) and day 15 (D15). Mineralization was visualized by Alizarin red S staining (ARS) at day 20 (D20). Arrowheads indicate mineralized bone nodules. Bar, 1 mm.

increased focal adhesion formation. Our hypothesis is that either ICAP-1 loss or increase in kindlin-2 expression favors $\beta 1$ localization at focal adhesion sites and disfavors its recruitment at fibrillar adhesions. However, this view does not rule out

that $\beta 1$ integrin could be required at an early stage in focal adhesion assembly before being engaged in fibrillar adhesions. This would explain why cells need $\beta 1$ integrin activation for fibrillar adhesions to be formed (Green et al., 2009). Loss of ICAP-1

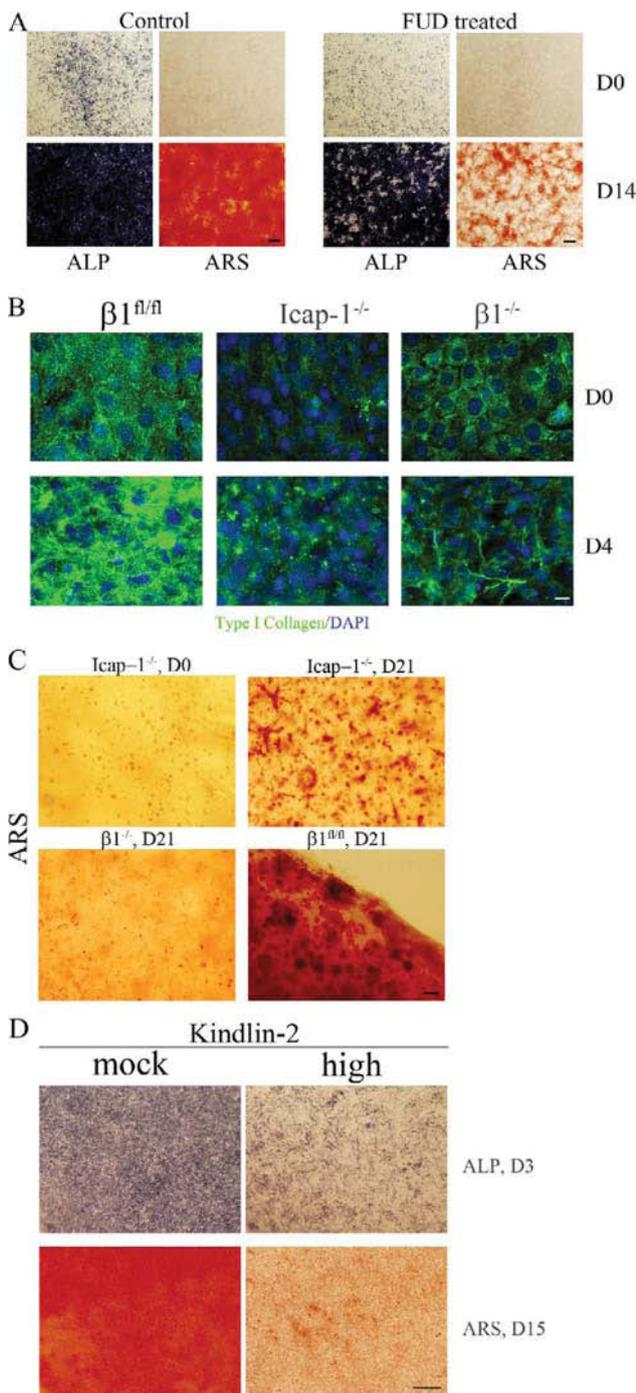


Figure 9. Blocking fibronectin fibrillogenesis impairs mineralization.

(A) Wild-type cells were induced to differentiate into osteoblasts in the presence (FUD treated) or absence (control) of FUD, and the expressions of alkaline phosphatase (ALP) and mineralization (Alizarin red S [ARS]) were monitored at day 0 (D0) and day 14 (D14). (B) Wild-type ($\beta 1^{fl/fl}$), $Icap-1^{-/-}$, and $\beta 1^{-/-}$ cells were cultured as described for in vitro mineralization assay. At day 0, the medium was changed to induce differentiation. Cells were fixed either at day 0 or day 4, and type I collagen deposition was analyzed by immunofluorescence staining. (C) Wild-type ($\beta 1^{fl/fl}$), $Icap-1^{-/-}$, and $\beta 1^{-/-}$ cells were embedded in highly concentrated type I collagen gel (5 mg/ml). After 1 wk in normal medium to allow cell proliferation, the medium was changed for the osteogenic medium, and the culture was continued for an additional 21 d. Gels were then stained with Alizarin red S to detect mineralized foci. (D) Mineralization of cells expressing high levels

would interfere with the release of integrin-associated proteins, such as kindlin and talin in focal adhesions and, thereby, would reduce the formation or maturation of fibrillar adhesion sites. Additional work should be performed to decipher at the molecular level how $\beta 1$ integrin participates in focal to fibrillar adhesion assembly. But, for the first time, our present work points out the importance of integrin cellular adaptors in this process.

Integrin-linked kinase (ILK), PINCH, parvins, and kindlins belong to a protein complex that is involved in fibrillar adhesion maturation (Vouret-Craviari et al., 2004; Stanchi et al., 2009). Loss of kindlins in mice leads to severe phenotypes associated with integrin dysfunction in cells (Moser et al., 2008, 2009; Ussar et al., 2008). Kindlins bind to the most distal NPxY motif on the $\beta 1$ integrin cytoplasmic tail (Meves et al., 2009), where the ICAP-1 binding site has also been mapped (Chang et al., 1997). Thus, the two proteins would be expected to compete for the same overlapping site. This hypothesis is supported by our experiments demonstrating that the loss of ICAP-1 or the expression of a $\beta 1$ integrin mutation within the ICAP-1 binding site increases kindlin-2 recruitment on the $\beta 1$ integrin cytoplasmic domain and within focal adhesion sites. ILK, which is recruited at focal adhesion via kindlin-2 in worm and C2C12 cells (Mackinnon et al., 2002; Dowling et al., 2008), is also involved in fibronectin deposition (Stanchi et al., 2009). Although the interplay among ILK, ICAP-1, and kindlin-2 remains to be unraveled, one may now place ILK downstream of ICAP-1 as well as kindlin-2.

Fibronectin fibrillogenesis is required for osteoblast mineralization

Both the composition and the physical state of the extracellular matrix play an important role in controlling osteoblast differentiation and mineralization. For instance, hMSCs cultured on a stiff matrix preferentially commit to the osteoblast lineage (McBeath et al., 2004; Engler et al., 2006). The extracellular matrix can affect osteoblast differentiation both by providing specific integrin binding sites and by acting as a reservoir for small signaling molecules, such as BMPs or FGFs (Margosio et al., 2003; Grünert et al., 2007). Previous studies have established the involvement of the extracellular matrix in osteoblast differentiation and mineralization (Moursi et al., 1996, 1997). Indeed, fibronectin has been shown to be important for osteoblast differentiation and survival (Moursi et al., 1996, 1997). Our present study not only provides important molecular mechanisms explaining these data but also shows the first direct experimental evidence that fibronectin assembly in itself is crucial for mineralization. By modulating $\beta 1$ integrin translocation into fibrillar adhesions, ICAP-1 regulates the amount, the structure, and the assembly of matrix-associated fibronectin, which is important for the formation of a competent extracellular matrix allowing proper mineralization. Our attempts to identify the specific integrin receptors involved in this process by using

of kindlin-2 (high) was analyzed after their culture in osteoblast differentiation media. Expression of alkaline phosphatase was used to follow the early commitment of cells to the osteoblast lineage at day 3 (D3), and mineralization was visualized by Alizarin red S staining at day 15 (D15). Bars: (A, C, and D) 1 mm; (B) 20 μ m.

blocking antibodies raised against specific α subunits have failed, possibly because of quick endocytosis of the antibodies during the course of the experiment (unpublished data). However, considering the predominant role of the $\alpha 5\beta 1$ integrin for fibronectin fibrillogenesis, it is likely that this integrin is also crucial for mineralization. It has been reported that fibronectin serves as a scaffolding matrix for additional extracellular proteins, such as collagens and TGF- β , but also for sequestering and presenting diffusible factors, such as BMPs and FGFs (Sottile and Hocking, 2002; Huang et al., 2009; Hynes, 2009). Therefore, interfering with fibronectin assembly will affect the overall matrix environment, making it less permissive for proper mineralization. In line with our present data is the observation that the maintenance of an extracellular matrix of fibronectin as well as collagen requires continuous fibronectin assembly (Sottile and Hocking, 2002; Shi et al., 2010).

Fibronectin is important for osteoblast compaction

Osteoblast compaction is an important early step during their differentiation (Lecanda et al., 2000). In the absence of efficient fibronectin assembly, osteoblast compaction was severely reduced. Therefore, *Icap-1*-deficient osteoblasts that displayed reduced fibronectin deposition were unable to properly compact. Similarly, osteoblasts deficient in $\beta 1$ integrin expression had a severe defect in cell compaction. Consistent with our findings, fibronectin is important for cell compaction of mesenchymal cells, showing that a proper extracellular matrix also supports cell compaction in the mesenchymal cell lineage (Robinson et al., 2004; Salmenperä et al., 2008). Surprisingly, cadherins expressed on osteoblasts (Stains and Civitelli, 2005) are not sufficient to support efficient cell compaction in the absence of $\beta 1$ integrin even though small cell aggregates were observed in $\beta 1$ -null osteoblasts, suggesting that cadherins could be involved at earlier stages. More investigations will be necessary to address the exact function of cadherins during this process.

ROCK has been shown to interact with ICAP-1 (Stroeken et al., 2006). In our present work, we did not evidence any linear connection between ICAP-1 and ROCK in the regulation of cell compaction. Indeed, inhibition of ROCK as well as loss of ICAP-1 expression led to cell compaction and the fibronectin deposition defect. However, ROCK inhibition in *Icap-1*-deficient cells further reduced cell compaction and fibronectin fibrillogenesis, suggesting that both proteins may act through distinct signaling pathways. Such ROCK-dependent pathways could be activated via the fibronectin receptor syndecan as recently proposed (Wang et al., 2010).

In conclusion, we report a molecular mechanism for the osteoblast differentiation defect that is present in *Icap-1*-deficient mice. ICAP-1, likely by interacting directly with $\beta 1$ integrin, is important for translocation of $\beta 1$ integrins into fibrillar adhesions, which are required for proper fibronectin self-assembly into fibrils. Moreover, we show that fibronectin assembly, in turn, allows mineralization. Thus, for the first time, we provide the mechanism by which ICAP-1 affects bone mineralization at a late stage of osteoblast differentiation.

Materials and methods

Mice and antibodies

Mice with a targeted mutation on the *Icap-1* locus (*Itgb1*bp1^{tm1Ref}) were genotyped as previously reported (Bouvard et al., 2007). Mouse strains with floxed alleles of the genes encoding $\beta 1$ integrin (*Itgb1*^{tm1Ref}) and fibronectin (*Fn1*^{tm1Ref}) have been described previously (Brakebusch et al., 2000; Potocnik et al., 2000; Sakai et al., 2001).

Polyclonal anti-ICAP-1 antibodies were described previously (1:1,500; Bouvard et al., 1998). Monoclonal antibodies against actin (A2066; 1:1,000), vinculin (clone hVIN1; 1:2,000), and talin (clone 8d4; 1:200) as well as the polyclonal antibodies against fibronectin (F3648; 1:1,000) and kindlin-2 (K3269; 1:1,000) were obtained from Sigma-Aldrich. The polyclonal anti- $\beta 1$ integrin serum was obtained from Millipore (1:1,500). The polyclonal anti- $\beta 1$ integrin cytoplasmic domain antibody was described previously (Martel et al., 2001). The monoclonal anti- $\beta 1$ integrin antibodies 9EG7 and MB1.2 were purchased from BD (1:100) and Millipore (1:100), respectively. Antiphosphotyrosine monoclonal antibody 4G10 used as hybridoma supernatant was produced in our laboratory. The monoclonal anti-EGFP antibody (b-2; 1:1,000) was purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Plasmids

The $\beta 1$ -expressing construct was based on the pCLMFG retroviral vector, in which the wild-type human $\beta 1$ integrin had been directionally inserted using EcoR1 and Not1 sites. D759A and V787T mutations were introduced in $\beta 1$ integrin by a mutation kit QuikChange; QIAGEN and verified by sequencing. Expression of mRFP-tensin was performed using the pCLMFG-mRFP-tensin plasmid as previously described (Stanchi et al., 2009). FUD arises from the first fibronectin binding motif of the *Streptococcus pyogenes* adhesin protein F1. It encompasses the 43 residues of the upstream nonrepetitive domain plus the first six residues of the first 37-residue repeat of the RD5 region (Tomasini-Johansson et al., 2001). FUD was produced recombinantly as previously described (Ensenberger et al., 2004). pCLMFG-EGFP-kindlin-2 was obtained from R. Fässler (Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried, Germany). cDNA encoding the talin head domain was extracted from pBlueScript(SK-)-talin (aa 1–1,445; gift from R.O. Hynes, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA) using Spe1 and EcoRV sites and inserted in the pEGFP-N1 plasmid by SalI restriction after refilling.

Isolation, immortalization, infection, and in vitro Cre-mediated deletion of osteoblasts

A primary mouse osteoblast-enriched cell population was isolated from newborn calvaria by using a mixture of 0.3 mg/ml collagenase type I (Sigma-Aldrich) and 0.25% trypsin (Invitrogen) as described previously (Bellows et al., 1986; Bouvard et al., 2007). Cells were grown in α -MEM medium containing 10% FCS. Primary osteoblasts (passage 2) were immortalized by transduction with a retrovirus expressing the large SV40 T antigen (Fässler et al., 1995), cloned, and tested for their ability to induce alkaline phosphatase upon differentiation (Mansukhani et al., 2000) as previously described (Bouvard et al., 2007). At least five clones from wild-type or floxed mice were isolated. Rescue of ICAP-1 or $\beta 1$ integrin expression in null cells was performed via retroviral infection using the pCLMFG-*Icap-1*-IRES-EGFP and the pCLMFG- $\beta 1$ vectors, respectively, as previously described (Bouvard et al., 2007; Millon-Frémillon et al., 2008). $\beta 1$ - and fibronectin-floxed immortalized osteoblasts were infected with an adenoviral supernatant encoding the Cre recombinase (provided by R. Meuwissen, Institut Albert Bonniot, Grenoble, France) for 1 h in PBS supplemented with 2% FCS and 1 mM MgCl₂.

Solid-phase assay and pull-down assay

ICAP-1 binding onto the cytoplasmic tail of $\beta 1^{WT}$ or $\beta 1^{V787T}$ integrin was performed using an enzyme-linked immunosorbent assay. A 96-well tray (MaxiSorp; Thermo Fisher Scientific) was coated overnight at 4°C with various concentrations of His-ICAP-1 (0, 1, and 5 μ g/ml) and blocked for 1 h at room temperature with a 3% BSA/PBS solution. 5 μ g/well GST, 3% BSA alone, or 10 μ g/well GST-tagged cytoplasmic $\beta 1^{WT}$ and cytoplasmic $\beta 1^{V787T}$ were incubated for 1 h at 37°C. After three washes with 3% BSA/0.01% Tween 20/PBS, the cytoplasmic $\beta 1^{WT}$ and cytoplasmic $\beta 1^{V787T}$ peptides were detected using a polyclonal antibody against the $\beta 1$ cytoplasmic tail for 45 min at 37°C and an HRP-conjugated secondary antibody (Bio-Rad Laboratories) for an additional 45 min at 37°C. Peroxidase activity was visualized using ABTS reagent at 405 nm. The efficiency of ICAP-1 binding onto cytoplasmic $\beta 1^{WT}$ or cytoplasmic $\beta 1^{V787T}$ was expressed after subtraction of GST and BSA signals.

Pull-down assays for talin and kindlin-2 were performed as previously described (Lad et al., 2007). In brief, either HEK 293 or ICAP-1-transfected HEK 293 cells were washed with cold PBS and lysed by scraping in 0.5 ml cell lysis buffer (50 mM NaCl, 10 mM Pipes, 150 mM sucrose, 50 mM NaF, 40 mM Na₄P₂O₇·10H₂O, 1 mM Na₃VO₄, pH 6.8, 0.5% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, and EDTA-free protease inhibitor tablet) on ice. The cell lysate was cleared by centrifugation at 15,000 g for 30 min at 4°C. 500 µg lysate was incubated with 10 µg GST-β1-, GST-β3-, or GST-coated beads for 2 h at 4°C. After three washes in lysis buffer, beads were resuspended in 2x Laemmli buffer, and samples were used in Western blotting to visualize talin and kindlin-2.

Compaction assay in hanging drops

Immortalized cells were harvested by trypsin digestion and washed twice in DME medium. Drops of 10 µl DME-FCS (10%) medium containing 25,000 cells were spotted onto the coverlid of 10-cm Petri dishes, inverted, and placed on a Petri dish containing 8 ml PBS. Spheroid compaction was then followed over a 72 h period, and images were taken with a binocular microscope (SMZ-2T; Nikon) equipped with a digital camera (DP70; Olympus). When ROCK inhibitor Y27632 (EMD) was used, cells were resuspended into DME-FCS supplemented with 10 µM Y27632 and then spotted on the coverlid as described previously in this paper.

Osteoblast differentiation

In vitro differentiation of isolated osteoblasts was performed essentially as previously described (Globus et al., 1998). In brief, 60,000 cells per well were plated in a 24-well tray. After 3 d of culture, when cells were confluent, the medium was switched to differentiation medium (α-MEM, 10% FCS, 50 µg/ml ascorbic acid, and 10 mM β-glycerophosphate) and changed every other day. The differentiation process was visualized by alkaline phosphatase staining for osteoblast activity and by Alizarin red S staining for calcium deposition as previously described (Bouvard et al., 2007). For collagen gel mineralization, a highly concentrated type I collagen solution was used (9.3 mg/ml; BD). A total of 300 µl type I collagen (5 mg/ml final concentration) containing 8 × 10⁵ cells per gel was loaded in a 24-well plate. Gels were grown for 1 wk and then placed in differentiation medium for 3 wk. Gels were stained directly with Alizarin red S dye or cryosectioned before staining.

Visualization and quantification of fibronectin deposition and secretion

10⁴ cells were seeded into a 24-well tray and cultured for 3 d in complete medium. Matrix-associated fibronectin was extracted after cell lysis in deoxycholate-containing buffer and centrifugation (15,000 rpm for 30 min at 4°C) as previously described (Schwarzbauer, 1991). The pellet fraction containing the pool of fibronectin associated within the matrix is referred to as insoluble fibronectin, whereas supernatant fibronectin is referred to as soluble fibronectin. Western blotting was performed as described previously (Bouvard et al., 1998). Quantification of fibronectin in soluble and insoluble fractions was performed using ImageJ (National Institutes of Health). Samples were also blotted for vinculin (1:1,500) or actin (1:1,500) to ensure that the same amounts of protein were loaded. ROCK inhibitor Y27632 (EMD) was used at the final concentration of 10 µM and added to cells seeded into a 24-well tray.

For fibronectin secretion, cells were incubated overnight in serum-free condition. Both culture supernatant and cells were used to visualize by Western blotting the amount of secreted and cellular fibronectin. Band intensity was quantified using ImageJ software.

For cellular fibronectin, cells were resuspended in trypsin/EDTA. Trypsin was then blocked with soybean trypsin inhibitor, and cells were washed twice in PBS (this treatment leads to an undetectable amount of cell surface-associated fibronectin as measured by FACS). Then, cells were lysed in radioimmunoprecipitation assay buffer, and equal amounts of protein were loaded on a gel for Western blotting to quantify fibronectin expression.

RNA isolation and real-time quantitative PCR

Total RNA was harvested from wild-type and *Icap-1*-null cell cultures by a minispin kit (NucleoSpin RNA II; Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. Then, 1.5 µg total RNA was reverse transcribed using a cDNA synthesis kit (SuperScript VIL0; Invitrogen) and 0.4 µl of the resulting cDNA reaction mix was subjected to quantitative PCR using quantitative PCR mix (GoTaq qPCR Master Mix; Promega) in a real-time PCR system (Mx3005P; Agilent Technologies). Real-time data were collected for 40 cycles at 95°C for 30 s, 55°C for 1 min, and 72°C for 30 s.

Mouse primers for fibronectin and collagen I were the following: forward, 5'-ATGTGGACCCCTCCTGATAGT-3', and reverse, 5'-GCCAGTGATTCAGCAAAGG-3'; and forward, 5'-CCTGGTAAAGATGGGCC-3', and reverse, 5'-CACCAAGTTCACCTTCGCACC-3', respectively. The level of RNA for *Icap-1*-null cells compared with wild-type cells and normalized to Ranp1 was calculated using the comparative cycle threshold method of quantification.

Time-lapse video microscopy

mRFP-tensin-expressing osteoblasts were seeded in complete medium on uncoated chambers (Labtek; Thermo Fisher Scientific) and imaged as previously described (Millon-Frémillon et al., 2008). In brief, after overnight spreading, cells were subjected to time-lapse video microscopy using a microscope (Axiovert 200M; Carl Zeiss) equipped with a thermostatic chamber. Images were acquired every 5 min over a 6-h period. Out of the stack, three images corresponding to three different time points were then selected and overlapped using MetaMorph software (Molecular Devices) after subtracting cell displacement. The centripetal translocation of fibrillar adhesions was shown by arbitrarily coloring each time-point image.

FACS, immunohistology, and immunofluorescence

FACS analysis and immunohistology were performed as previously described (Bouvard et al., 2007). For immunofluorescence, cells were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.2% Triton X-100 (this step was omitted in the case of fibronectin staining), and incubated with appropriate primary antibodies. After being rinsed, coverslips were incubated with an appropriate Alexa Fluor-conjugated secondary antibody. The cells were mounted in Mowiol/DAPI solution and imaged on an inverted confocal microscope (LSM510; Carl Zeiss).

Online supplemental material

Fig. S1 shows expression and localization of β1 integrins and its mutated forms in β1-null osteoblasts. Fig. S2 shows that FUD treatment alters neither cell shape nor cell proliferation and survival. Fig. S3 shows that *Icap-1*^{-/-} spheroids exhibit a defect in fibronectin deposition that is not caused by a defect in fibronectin and type I collagen expression or fibronectin secretion. Fig. S4 shows that β1^{V787I} integrin mutation interferes with ICAP-1 binding but not with kindlin-2 recruitment. Fig. S5 shows a defect in the translocation of β1-containing fibrillar adhesion. Online supplemental material is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.201007108/DC1>.

This work is dedicated to Rachel.

We are grateful to Dr. Reinhard Fässler for providing us with β1 integrin- and fibronectin-floxed mice and the EGFP-kindlin-2 construct and for critical reading of the manuscript. We also thank Drs. Martin Humphries and M. Billaud for their critical reading and suggestions. We thank Dr. Alexei Grichine for microscopy and Dr. Juliana Ribeyron and Dr. Sandrine De Seranno for FACS sorting.

M. Brunner is supported by a Ministère de la Recherche et Technologie fellowship, and A. Millon-Frémillon was supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer. This research was supported by a Pro-A Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale grant and Ligue Contre le Cancer (to D. Bouvard), National Institutes of Health grant HL21644 (to D. Mosher), the Max Planck Society and the University of Heidelberg (to I. Nakhbandi), and the Association pour la Recherche sur le Cancer and Région Rhône-Alpes (to C. Albigès-Rizo). The team is supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer as Equipe Labellisée Ligue 2010.

Submitted: 20 July 2010

Accepted: 21 June 2011

References

- Anthis, N.J., K.L. Wegener, F. Ye, C. Kim, B.T. Goult, E.D. Lowe, I. Vakonakis, N. Bate, D.R. Critchley, M.H. Ginsberg, and I.D. Campbell. 2009. The structure of an integrin/talin complex reveals the basis of inside-out signal transduction. *EMBO J.* 28:3623–3632. doi:10.1038/emboj.2009.287
- Bellows, C.G., J. Sodek, K.L. Yao, and J.E. Aubin. 1986. Phenotypic differences in subclones and long-term cultures of clonally derived rat bone cell lines. *J. Cell. Biochem.* 31:153–169. doi:10.1002/jcb.240310207
- Bentmann, A., N. Kawelke, D. Moss, H. Zentgraf, Y. Bala, I. Berger, J.A. Gasser, and I.A. Nakhbandi. 2010. Circulating fibronectin affects bone matrix, whereas osteoblast fibronectin modulates osteoblast function. *J. Bone Miner. Res.* 25:706–715.

- Bouvard, D., A. Molla, and M.R. Block. 1998. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II controls alpha5beta1 integrin-mediated inside-out signaling. *J. Cell Sci.* 111:657–665.
- Bouvard, D., C. Brakebusch, E. Gustafsson, A. Aszodi, T. Bengtsson, A. Berna, and R. Fassler. 2001. Functional consequences of integrin gene mutations in mice. *Circ. Res.* 89:211–223. doi:10.1161/hh1501.094874
- Bouvard, D., L. Vignoud, S. Dupé-Manet, N. Abed, H.N. Fournier, C. Vincent-Monegat, S.F. Retta, R. Fassler, and M.R. Block. 2003. Disruption of focal adhesions by integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 alpha. *J. Biol. Chem.* 278:6567–6574. doi:10.1074/jbc.M211258200
- Bouvard, D., A. Millon-Fremillon, S. Dupe-Manet, M.R. Block, and C. Albigès-Rizo. 2006. Unraveling ICAP-1 function: toward a new direction? *Eur. J. Cell Biol.* 85:275–282. doi:10.1016/j.ejcb.2005.10.005
- Bouvard, D., A. Aszodi, G. Kostka, M.R. Block, C. Albigès-Rizo, and R. Fassler. 2007. Defective osteoblast function in ICAP-1-deficient mice. *Development.* 134:2615–2625. doi:10.1242/dev.000877
- Brakebusch, C., R. Grose, F. Quondamatteo, A. Ramirez, J.L. Jorcano, A. Pirro, M. Svensson, R. Herken, T. Sasaki, R. Timpl, et al. 2000. Skin and hair follicle integrity is crucially dependent on beta 1 integrin expression on keratinocytes. *EMBO J.* 19:3990–4003. doi:10.1093/emboj/19.15.3990
- Chang, D.D., C. Wong, H. Smith, and J. Liu. 1997. ICAP-1, a novel beta 1 integrin cytoplasmic domain-associated protein, binds to a conserved and functionally important NPXY sequence motif of beta 1 integrin. *J. Cell Biol.* 138:1149–1157. doi:10.1083/jcb.138.5.1149
- Chang, D.D., B.Q. Hoang, J. Liu, and T.A. Springer. 2002. Molecular basis for interaction between Icap1 alpha PTB domain and beta 1 integrin. *J. Biol. Chem.* 277:8140–8145. doi:10.1074/jbc.M109031200
- Chiba, H., N. Sawada, T. Ono, S. Ishii, and M. Mori. 1993. Establishment and characterization of a simian virus 40-immortalized osteoblastic cell line from normal human bone. *Jpn. J. Cancer Res.* 84:290–297.
- Cukierman, E., R. Pankov, D.R. Stevens, and K.M. Yamada. 2001. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science.* 294:1708–1712. doi:10.1126/science.1064829
- Czuchra, A., H. Meyer, K.R. Legate, C. Brakebusch, and R. Fassler. 2006. Genetic analysis of beta 1 integrin “activation motifs” in mice. *J. Cell Biol.* 174:889–899. doi:10.1083/jcb.200604060
- Dallas, S.L., P. Sivakumar, C.J. Jones, Q. Chen, D.M. Peters, D.F. Mosher, M.J. Humphries, and C.M. Kielty. 2005. Fibronectin regulates latent transforming growth factor-beta (TGF beta) by controlling matrix assembly of latent TGF beta-binding protein-1. *J. Biol. Chem.* 280:18871–18880. doi:10.1074/jbc.M410762200
- Dowling, J.J., A.P. Vreede, S. Kim, J. Golden, and E.L. Feldman. 2008. Kindlin-2 is required for myocyte elongation and is essential for myogenesis. *BMC Cell Biol.* 9:36. doi:10.1186/1471-2121-9-36
- Engler, A.J., S. Sen, H.L. Sweeney, and D.E. Discher. 2006. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell.* 126:677–689. doi:10.1016/j.cell.2006.06.044
- Ensenberger, M.G., B.R. Tomasini-Johansson, J. Sottile, V. Ozeri, E. Hanski, and D.F. Mosher. 2001. Specific interactions between F1 adhesion of *Streptococcus pyogenes* and N-terminal modules of fibronectin. *J. Biol. Chem.* 276:35606–35613. doi:10.1074/jbc.M105417200
- Ensenberger, M.G., D.S. Annis, and D.F. Mosher. 2004. Actions of the functional upstream domain of protein F1 of *Streptococcus pyogenes* on the conformation of fibronectin. *Biophys. Chem.* 112:201–207. doi:10.1016/j.bpc.2004.07.020
- Fässler, R., M. Pfaff, J. Murphy, A.A. Noegel, S. Johansson, R. Timpl, and R. Albrecht. 1995. Lack of beta 1 integrin gene in embryonic stem cells affects morphology, adhesion, and migration but not integration into the inner cell mass of blastocysts. *J. Cell Biol.* 128:979–988. doi:10.1083/jcb.128.5.979
- Fontana, L., Y. Chen, P. Prijatelj, T. Sakai, R. Fassler, L.Y. Sakai, and D.B. Rifkin. 2005. Fibronectin is required for integrin alphavbeta6-mediated activation of latent TGF-beta complexes containing LTBP-1. *FASEB J.* 19:1798–1808. doi:10.1096/fj.05-4134.com
- Giancotti, F.G., and E. Ruoslahti. 1999. Integrin signaling. *Science.* 285:1028–1032. doi:10.1126/science.285.5430.1028
- Globus, R.K., S.B. Doty, J.C. Lull, E. Holmuhamedov, M.J. Humphries, and C.H. Damsky. 1998. Fibronectin is a survival factor for differentiated osteoblasts. *J. Cell Sci.* 111:1385–1393.
- Green, J.A., A.L. Berrier, R. Pankov, and K.M. Yamada. 2009. beta1 integrin cytoplasmic domain residues selectively modulate fibronectin matrix assembly and cell spreading through talin and Akt-1. *J. Biol. Chem.* 284:8148–8159. doi:10.1074/jbc.M805934200
- Grünert, M., C. Dombrowski, M. Sadasivam, K. Manton, S.M. Cool, and V. Nurcombe. 2007. Isolation of a native osteoblast matrix with a specific affinity for BMP2. *J. Mol. Histol.* 38:393–404. doi:10.1007/s10735-007-9119-0
- Hall, B.K., and T. Miyake. 2000. All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays.* 22:138–147. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(200002)22:2<138::AID-BIES5>3.0.CO;2-4
- Hamidouche, Z., O. Fromigué, J. Ringe, T. Häupl, P. Vaudin, J.C. Pagès, S. Srouji, E. Livne, and P.J. Marie. 2009. Priming integrin alpha5 promotes human mesenchymal stromal cell osteoblast differentiation and osteogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106:18587–18591. doi:10.1073/pnas.0812334106
- Huang, G., Y. Zhang, B. Kim, G. Ge, D.S. Annis, D.F. Mosher, and D.S. Greenspan. 2009. Fibronectin binds and enhances the activity of bone morphogenetic protein 1. *J. Biol. Chem.* 284:25879–25888. doi:10.1074/jbc.M109.024125
- Hughes, P.E., F. Diaz-Gonzalez, L. Leong, C. Wu, J.A. McDonald, S.J. Shattil, and M.H. Ginsberg. 1996. Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling. *J. Biol. Chem.* 271:6571–6574. doi:10.1074/jbc.271.12.6571
- Hynes, R.O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69:11–25. doi:10.1016/0092-8674(92)90115-S
- Hynes, R.O. 2009. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science.* 326:1216–1219. doi:10.1126/science.1176009
- Hynes, R.O., E.L. George, E.N. Georges, J.L. Guan, H. Rayburn, and J.T. Yang. 1992. Toward a genetic analysis of cell-matrix adhesion. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 57:249–258.
- Lad, Y., D.S. Harburger, and D.A. Calderwood. 2007. Integrin cytoskeletal interactions. *Methods Enzymol.* 426:69–84. doi:10.1016/S0076-6879(07)26004-5
- Larjava, H., E.F. Plow, and C. Wu. 2008. Kindlins: essential regulators of integrin signalling and cell-matrix adhesion. *EMBO Rep.* 9:1203–1208. doi:10.1038/embor.2008.202
- Lecanda, F., P.M. Warlow, S. Sheikh, F. Furlan, T.H. Steinberg, and R. Civitelli. 2000. Connexin43 deficiency causes delayed ossification, craniofacial abnormalities, and osteoblast dysfunction. *J. Cell Biol.* 151:931–944. doi:10.1083/jcb.151.4.931
- Ma, Y.Q., J. Qin, C. Wu, and E.F. Plow. 2008. Kindlin-2 (Mig-2): a co-activator of beta 3 integrins. *J. Cell Biol.* 181:439–446. doi:10.1083/jcb.200710196
- Mackinnon, A.C., H. Qadota, K.R. Norman, D.G. Moerman, and B.D. Williams. 2002. *C. elegans* PAT-4/ILK functions as an adaptor protein within integrin adhesion complexes. *Curr. Biol.* 12:787–797. doi:10.1016/S0960-9822(02)00810-2
- Manabe, R., K. Tsutsui, T. Yamada, M. Kimura, I. Nakano, C. Shimono, N. Sanzen, Y. Furutani, T. Fukuda, Y. Oguri, et al. 2008. Transcriptome-based systematic identification of extracellular matrix proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105:12849–12854. doi:10.1073/pnas.0803640105
- Mansukhani, A., P. Bellosta, M. Sahni, and C. Basilico. 2000. Signaling by fibroblast growth factors (FGF) and fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-activating mutations blocks mineralization and induces apoptosis in osteoblasts. *J. Cell Biol.* 149:1297–1308. doi:10.1083/jcb.149.6.1297
- Margosio, B., D. Marchetti, V. Vergani, R. Giavazzi, M. Rusnati, M. Presta, and G. Tarabozetti. 2003. Thrombospondin 1 as a scavenger for matrix-associated fibroblast growth factor 2. *Blood.* 102:4399–4406. doi:10.1182/blood-2003-03-0893
- Martel, V., C. Racadou-Sultan, S. Dupe, C. Marie, F. Paulhe, A. Galmiche, M.R. Block, and C. Albigès-Rizo. 2001. Conformation, localization, and integrin binding of talin depend on its interaction with phosphoinositides. *J. Biol. Chem.* 276:21217–21227. doi:10.1074/jbc.M102373200
- Matsuo, K. 2009. Cross-talk among bone cells. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 18:292–297. doi:10.1097/MNH.0b013e32832b75f1
- Maurer, L.M., B.R. Tomasini-Johansson, W. Ma, D.S. Annis, N.L. Eickstaedt, M.G. Ensenberger, K.A. Satyshur, and D.F. Mosher. 2010. Extended binding site on fibronectin for the functional upstream domain of protein F1 of *Streptococcus pyogenes*. *J. Biol. Chem.* 285:41087–41099. doi:10.1074/jbc.M110.153692
- McBeath, R., D.M. Pirone, C.M. Nelson, K. Bhadriraju, and C.S. Chen. 2004. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev. Cell.* 6:483–495. doi:10.1016/S1534-5807(04)00075-9
- Meves, A., C. Stremmel, K. Gottschalk, and R. Fassler. 2009. The Kindlin protein family: new members to the club of focal adhesion proteins. *Trends Cell Biol.* 19:504–513. doi:10.1016/j.tcb.2009.07.006
- Millon-Frémillon, A., D. Bouvard, A. Grichine, S. Manet-Dupé, M.R. Block, and C. Albigès-Rizo. 2008. Cell adaptive response to extracellular matrix density is controlled by ICAP-1-dependent beta 1-integrin affinity. *J. Cell Biol.* 180:427–441. doi:10.1083/jcb.200707142
- Montanez, E., S. Ussar, M. Schifferer, M. Bösl, R. Zent, M. Moser, and R. Fassler. 2008. Kindlin-2 controls bidirectional signaling of integrins. *Genes Dev.* 22:1325–1330. doi:10.1101/gad.469408

- Moser, M., B. Nieswandt, S. Ussar, M. Pozgajova, and R. Fässler. 2008. Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nat. Med.* 14:325–330. doi:10.1038/nm1722
- Moser, M., M. Bauer, S. Schmid, R. Ruppert, S. Schmidt, M. Sixt, H.V. Wang, M. Sperandio, and R. Fässler. 2009. Kindlin-3 is required for beta2 integrin-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells. *Nat. Med.* 15:300–305. doi:10.1038/nm.1921
- Moursi, A.M., C.H. Damsky, J. Lull, D. Zimmerman, S.B. Doty, S. Aota, and R.K. Globus. 1996. Fibronectin regulates calvarial osteoblast differentiation. *J. Cell Sci.* 109:1369–1380.
- Moursi, A.M., R.K. Globus, and C.H. Damsky. 1997. Interactions between integrin receptors and fibronectin are required for calvarial osteoblast differentiation in vitro. *J. Cell Sci.* 110:2187–2196.
- Pankov, R., E. Cukierman, B.Z. Katz, K. Matsumoto, D.C. Lin, S. Lin, C. Hahn, and K.M. Yamada. 2000. Integrin dynamics and matrix assembly: tensin-dependent translocation of $\alpha_5\beta_1$ integrins promotes early fibronectin fibrillogenesis. *J. Cell Biol.* 148:1075–1090. doi:10.1083/jcb.148.5.1075
- Phillips, J.A., E.A. Almeida, E.L. Hill, J.I. Aguirre, M.F. Rivera, I. Nachbandi, T.J. Wronski, M.C. van der Meulen, and R.K. Globus. 2008. Role for beta1 integrins in cortical osteocytes during acute musculoskeletal disuse. *Matrix Biol.* 27:609–618. doi:10.1016/j.matbio.2008.05.003
- Potocnik, A.J., C. Brakebusch, and R. Fässler. 2000. Fetal and adult hematopoietic stem cells require beta1 integrin function for colonizing fetal liver, spleen, and bone marrow. *Immunity.* 12:653–663. doi:10.1016/S1074-7613(00)80216-2
- Ramirez, F., and D.B. Rifkin. 2009. Extracellular microfibrils: contextual platforms for TGFbeta and BMP signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21:616–622. doi:10.1016/j.ceb.2009.05.005
- Robinson, E.E., R.A. Foty, and S.A. Corbett. 2004. Fibronectin matrix assembly regulates alpha5beta1-mediated cell cohesion. *Mol. Biol. Cell.* 15:973–981. doi:10.1091/mbc.E03-07-0528
- Rozario, T., and D.W. DeSimone. 2010. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev. Biol.* 341:126–140. doi:10.1016/j.ydbio.2009.10.026
- Sakai, T., Q. Zhang, R. Fässler, and D.F. Mosher. 1998. Modulation of β_1 A integrin functions by tyrosine residues in the β_1 cytoplasmic domain. *J. Cell Biol.* 141:527–538. doi:10.1083/jcb.141.2.527
- Sakai, T., K.J. Johnson, M. Murozono, K. Sakai, M.A. Magnuson, T. Wieloch, T. Cronberg, A. Isshiki, H.P. Erickson, and R. Fässler. 2001. Plasma fibronectin supports neuronal survival and reduces brain injury following transient focal cerebral ischemia but is not essential for skin-wound healing and hemostasis. *Nat. Med.* 7:324–330. doi:10.1038/85471
- Salmenperä, P., E. Kankuri, J. Bizik, V. Sirén, I. Virtanen, S. Takahashi, M. Leiss, R. Fässler, and A. Vaheri. 2008. Formation and activation of fibroblast spheroids depend on fibronectin-integrin interaction. *Exp. Cell Res.* 314:3444–3452. doi:10.1016/j.yexcr.2008.09.004
- Schwarzbauer, J.E. 1991. Identification of the fibronectin sequences required for assembly of a fibrillar matrix. *J. Cell Biol.* 113:1463–1473. doi:10.1083/jcb.113.6.1463
- Shi, F., J. Harman, K. Fujiwara, and J. Sottile. 2010. Collagen I matrix turnover is regulated by fibronectin polymerization. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298:C1265–C1275. doi:10.1152/ajpcell.00341.2009
- Sottile, J., and D.C. Hocking. 2002. Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions. *Mol. Biol. Cell.* 13:3546–3559. doi:10.1091/mbc.E02-01-0048
- Stains, J.P., and R. Civitelli. 2005. Cell-cell interactions in regulating osteogenesis and osteoblast function. *Birth Defects Res. C Embryo Today.* 75:72–80. doi:10.1002/bdrc.20034
- Stanchi, F., C. Grashoff, C.F. Nguemni Yonga, D. Grall, R. Fässler, and E. Van Obberghen-Schilling. 2009. Molecular dissection of the ILK-PINCH-parvin triad reveals a fundamental role for the ILK kinase domain in the late stages of focal-adhesion maturation. *J. Cell Sci.* 122:1800–1811. doi:10.1242/jcs.044602
- Stroeken, P.J., B. Alvarez, J. Van Rheenen, Y.M. Wijnands, D. Geerts, K. Jalink, and E. Roos. 2006. Integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 (ICAP-1) interacts with the ROCK-I kinase at the plasma membrane. *J. Cell. Physiol.* 208:620–628. doi:10.1002/jcp.20699
- Tomasini-Johansson, B.R., N.R. Kaufman, M.G. Ensenberger, V. Ozeri, E. Hanski, and D.F. Mosher. 2001. A 49-residue peptide from adhesin F1 of *Streptococcus pyogenes* inhibits fibronectin matrix assembly. *J. Biol. Chem.* 276:23430–23439. doi:10.1074/jbc.M103467200
- Ussar, S., M. Moser, M. Widmaier, E. Rognoni, C. Harrer, O. Genzel-Boroviczeny, and R. Fässler. 2008. Loss of Kindlin-1 causes skin atrophy and lethal neonatal intestinal epithelial dysfunction. *PLoS Genet.* 4:e1000289. doi:10.1371/journal.pgen.1000289
- Vouret-Craviari, V., E. Boulter, D. Grall, C. Matthews, and E. Van Obberghen-Schilling. 2004. ILK is required for the assembly of matrix-forming adhesions and capillary morphogenesis in endothelial cells. *J. Cell Sci.* 117:4559–4569. doi:10.1242/jcs.01331
- Wang, L., G. Zhao, R. Olivares-Navarrete, B.F. Bell, M. Wieland, D.L. Cochran, Z. Schwartz, and B.D. Boyan. 2006. Integrin beta1 silencing in osteoblasts alters substrate-dependent responses to 1,25-dihydroxy vitamin D3. *Biomaterials.* 27:3716–3725. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.02.022
- Wang, Z., R.J. Collighan, S.R. Gross, E.H. Danen, G. Orend, D. Telci, and M. Griffin. 2010. RGD-independent cell adhesion via a tissue transglutaminase-fibronectin matrix promotes fibronectin fibril deposition and requires syndecan-4/2 and alpha5beta1 integrin co-signaling. *J. Biol. Chem.* 285:40212–40229. doi:10.1074/jbc.M110.123703
- Xiao, G., D. Wang, M.D. Benson, G. Karsenty, and R.T. Franceschi. 1998. Role of the alpha2-integrin in osteoblast-specific gene expression and activation of the Osf2 transcription factor. *J. Biol. Chem.* 273:32988–32994. doi:10.1074/jbc.273.49.32988
- Yoneda, A., D. Ushakov, H.A. Multhaupt, and J.R. Couchman. 2007. Fibronectin matrix assembly requires distinct contributions from Rho kinases I and -II. *Mol. Biol. Cell.* 18:66–75. doi:10.1091/mbc.E06-08-0684
- Zamir, E., B.Z. Katz, S. Aota, K.M. Yamada, B. Geiger, and Z. Kam. 1999. Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.* 112:1655–1669.
- Zhang, Q., W.J. Checovich, D.M. Peters, R.M. Albrecht, and D.F. Mosher. 1994. Modulation of cell surface fibronectin assembly sites by lysophosphatidic acid. *J. Cell Biol.* 127:1447–1459. doi:10.1083/jcb.127.5.1447
- Zhang, X.A., and M.E. Hemler. 1999. Interaction of the integrin beta1 cytoplasmic domain with ICAP-1 protein. *J. Biol. Chem.* 274:11–19. doi:10.1074/jbc.274.1.11
- Zhong, C., M. Chrzanowska-Wodnicka, J. Brown, A. Shaub, A.M. Belkin, and K. Burridge. 1998. Rho-mediated contractility exposes a cryptic site in fibronectin and induces fibronectin matrix assembly. *J. Cell Biol.* 141:539–551. doi:10.1083/jcb.141.2.539
- Zhou, X., R.G. Rowe, N. Hiraoka, J.P. George, D. Wirtz, D.F. Mosher, I. Virtanen, M.A. Chernoousov, and S.J. Weiss. 2008. Fibronectin fibrillogenesis regulates three-dimensional neovessel formation. *Genes Dev.* 22:1231–1243. doi:10.1101/gad.1643308
- Zimmerman, D., F. Jin, P. Leboy, S. Hardy, and C. Damsky. 2000. Impaired bone formation in transgenic mice resulting from altered integrin function in osteoblasts. *Dev. Biol.* 220:2–15. doi:10.1006/dbio.2000.9633

Supplemental material

JCB

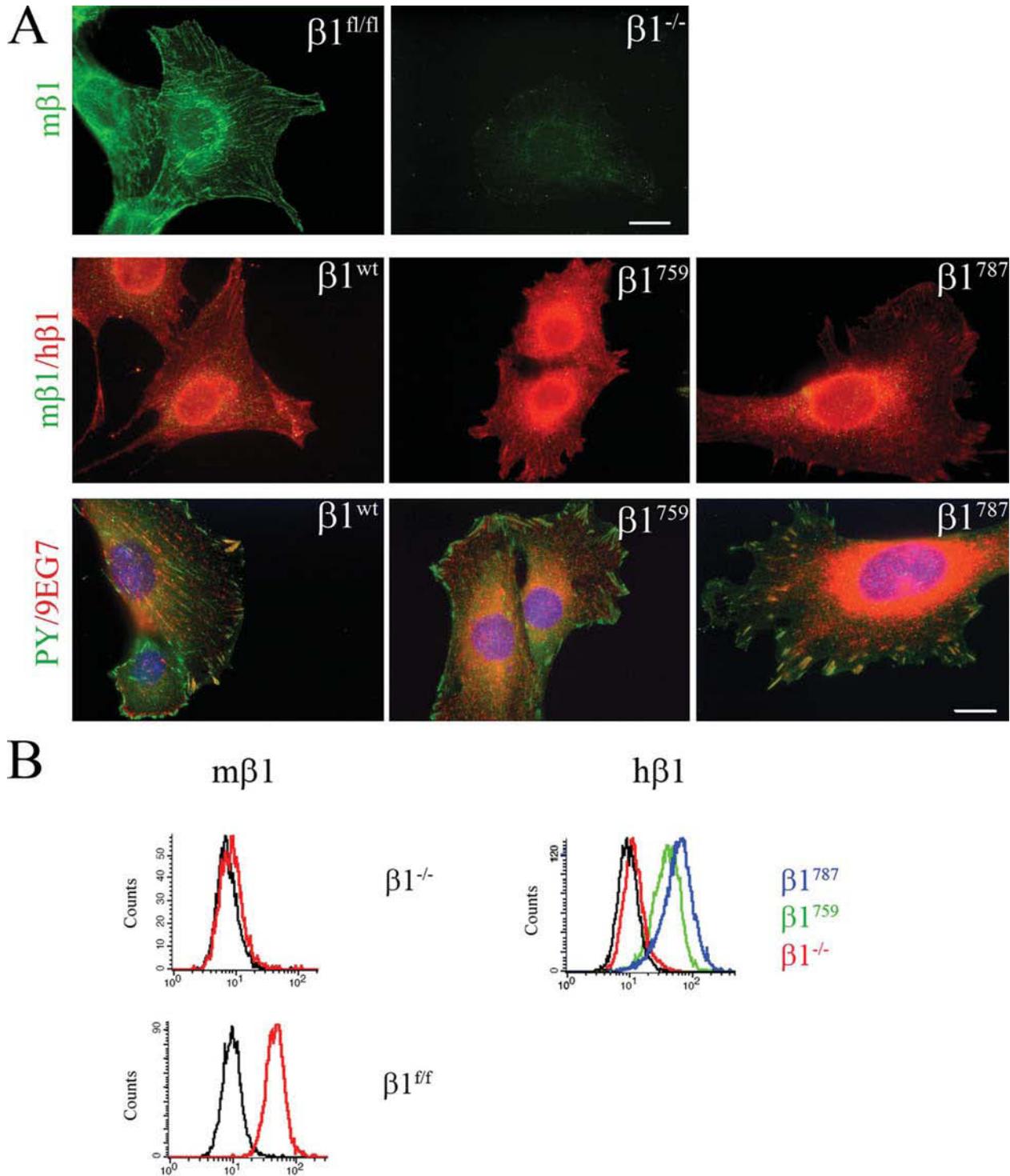
Brunner et al., <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.201007108/DC1>

Figure S1. **Expression of $\beta 1$ integrins and its mutated forms in $\beta 1$ -null osteoblasts.** (A) Wild-type ($\beta 1^{fl/fl}$), $\beta 1$ -null ($\beta 1^{-/-}$), and $\beta 1$ -null osteoblasts rescued with mutant $\beta 1$ integrins ($\beta 1^{V787I}$ and $\beta 1^{D759A}$) were stained at 4°C with anti-mouse $\beta 1$ integrin (m $\beta 1$) alone (top) or in combination with anti-human $\beta 1$ integrin (h $\beta 1$) or antiphosphotyrosine (PY). In this and the second row, cells with mutated $\beta 1$ are denoted by the site of mutation. (B) FACS analysis of integrin surface expression using either anti-mouse $\beta 1$ integrin (red) or anti-human $\beta 1$ integrin ($\beta 1^{-/-}$, $\beta 1^{759}$, and $\beta 1^{787}$) to detect ectopic expression of integrins. Bars, 10 μ m.

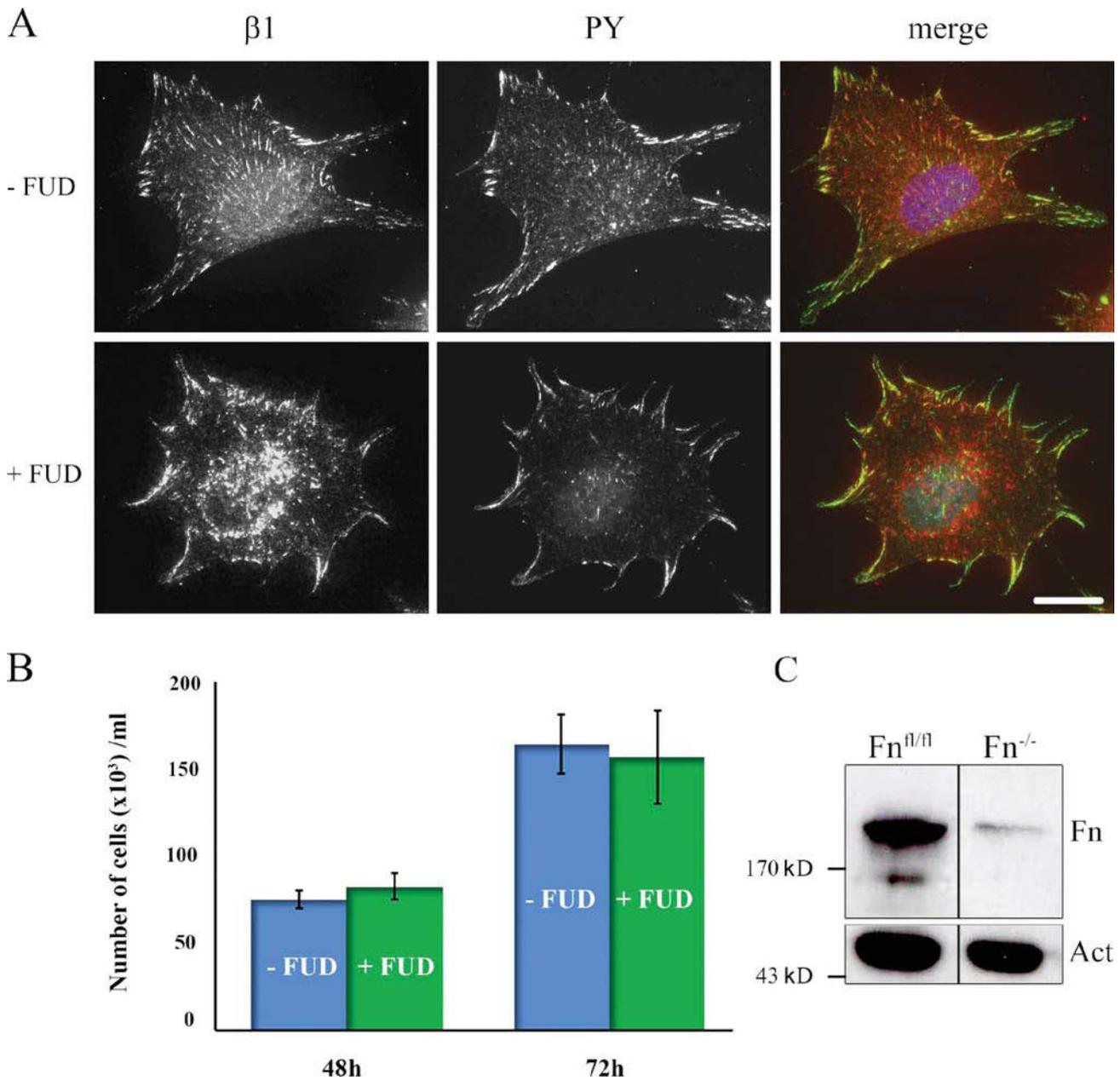


Figure S2. **FUD treatment alters neither cell shape nor cell proliferation and survival.** (A) After 4 h of culture in complete medium in the presence (+FUD) or absence (-FUD) of FUD, wild-type osteoblasts were fixed and immunostained for $\beta 1$ integrin and phosphotyrosine (PY) and counterstained with DAPI. Bar, 10 μ m. (B) To analyze cell proliferation and survival, wild-type osteoblasts were counted after 48 or 72 h of culture in the presence or absence of FUD. Data are the means and SDs of the cell count in 10 independent fields for each condition. (C) Wild-type ($Fn^{fl/fl}$) and fibronectin-null ($Fn^{-/-}$) osteoblasts were cultured in complete medium and then lysed. Fibronectin amounts were estimated by Western blot analysis. Protein load was normalized using actin. Black lines indicate that intervening lanes have been spliced out. Act, actin.

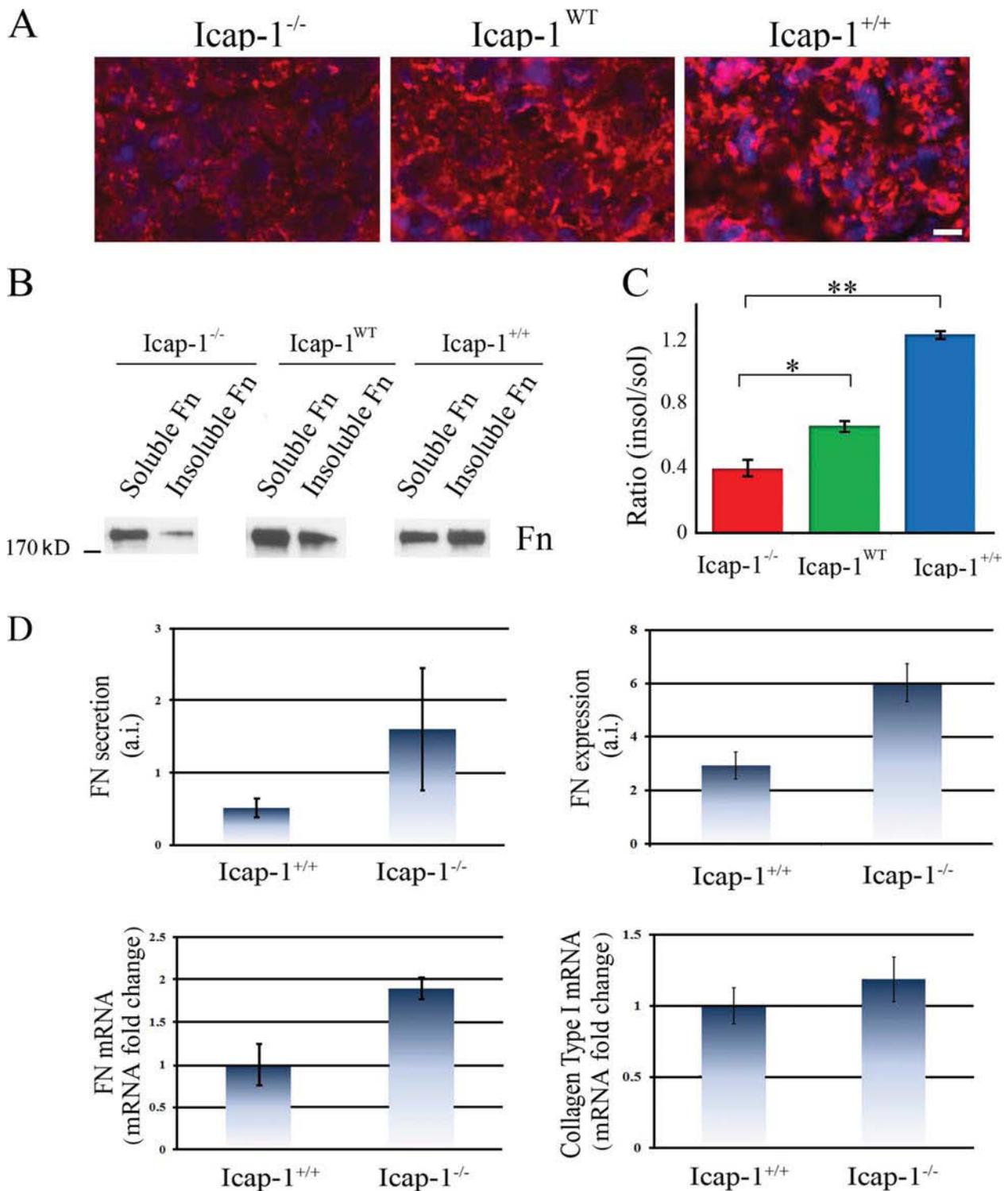


Figure S3. *Icap-1*^{-/-} spheroids exhibit a defect in fibronectin deposition that is not caused by a defect in fibronectin and type I collagen expression or fibronectin secretion. (A) Spheroids formed from *Icap-1*^{+/+} (wild type), *Icap-1*^{WT} (rescue), and *Icap-1*^{-/-} cells were fixed after 48 h, and frozen sections were immunostained for fibronectin and counterstained with DAPI. Bar, 20 μ m. (B) *Icap-1*^{+/+} (wild type), *Icap-1*^{WT} (rescue), and *Icap-1*^{-/-} spheroids were lysed in a buffer containing deoxycholate followed by centrifugation to separate insoluble matrix-bound fibronectin from soluble fibronectin (Fn). Fibronectin amounts were estimated by Western blot analysis. (C) Summary of results of four independent experiments for determining the ratio of soluble (sol) and insoluble (insol) fibronectin. Quantification was accomplished using ImageJ analysis software and is presented as the means and SDs of the ratio of insoluble/soluble fibronectin fraction (a double asterisk shows a significant difference with $P < 0.001$; a single asterisk shows significant difference with a $P < 0.01$). (D) Fibronectin expression and secretion in the supernatant of wild-type (*Icap-1*^{+/+}) and *Icap-1*-null (*Icap-1*^{-/-}) cell cultures were visualized by Western blot analyses and quantified and shown as the means and SDs of five independent experiments using ImageJ software (top; a. i., arbitrary unit.). Fibronectin and type I collagen mRNA levels were quantified using quantitative real-time PCR (bottom).

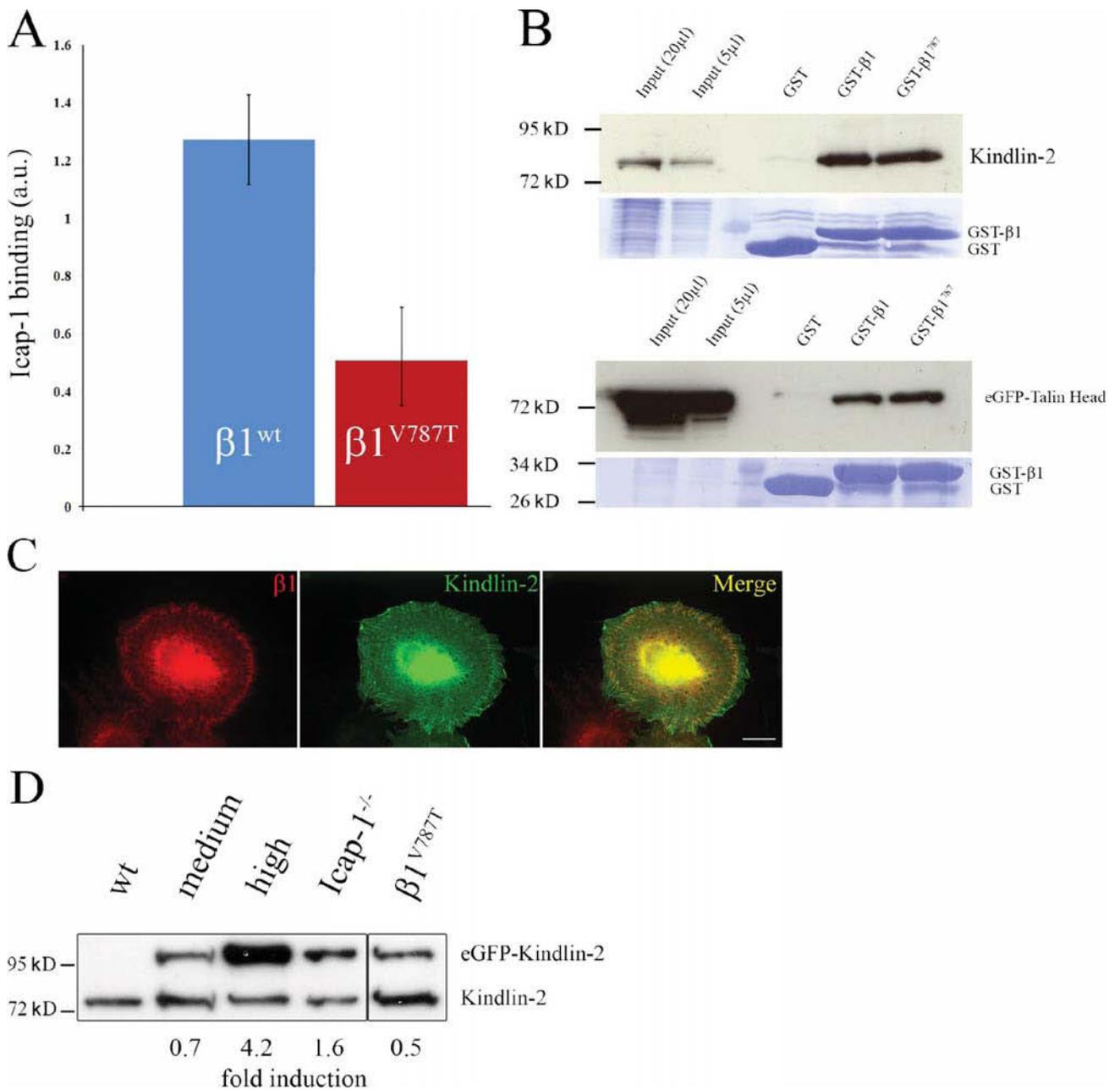


Figure S4. $\beta 1^{V787T}$ integrin mutation interferes with ICAP-1 binding but not with kindlin-2 recruitment. (A) ICAP-1 binding was assessed using solid-phase assay and background on BSA, and GST was subtracted. Specificity was also verified by the absence of binding of His-ICAP-1 onto GST-cytoplasmic $\beta 3$ domain (not depicted). Data are shown as the means and SDs of three independent experiments. (B) Kindlin-2 and EGFP-talin head binding on wild-type or mutant ($\beta 1^{V787T}$) $\beta 1$ integrin was analyzed using a pull-down assay. Bindings on GST alone, GST- $\beta 1$, and GST- $\beta 1^{V787T}$ were visualized by Western blotting. In B, cells with mutated $\beta 1$ are denoted by the site of mutation. (C) Localization of EGFP-kindlin-2 in $\beta 1^{V787T}$ -expressing cells. Cells were stably transduced with a supernatant containing retroviruses encoding EGFP-kindlin-2. Cells were plated on fibronectin-coated glass coverslips, and localization of $\beta 1$ integrin was determined using the 9EG7 antibody. Bar, 10 μ m. (D) Wild-type (wt) cells expressing medium and high levels of EGFP-kindlin-2 (medium and high, respectively) and *Icap-1* null and cells expressing the mutated $\beta 1^{V787T}$ integrin were cultured in complete medium and then lysed. Kindlin-2 amounts were estimated by Western blot analysis. The ratio of EGFP-kindlin-2 fusion expression to endogenous kindlin-2 expression is indicated. The black line indicates that intervening lanes have been spliced out. a.u., arbitrary unit.

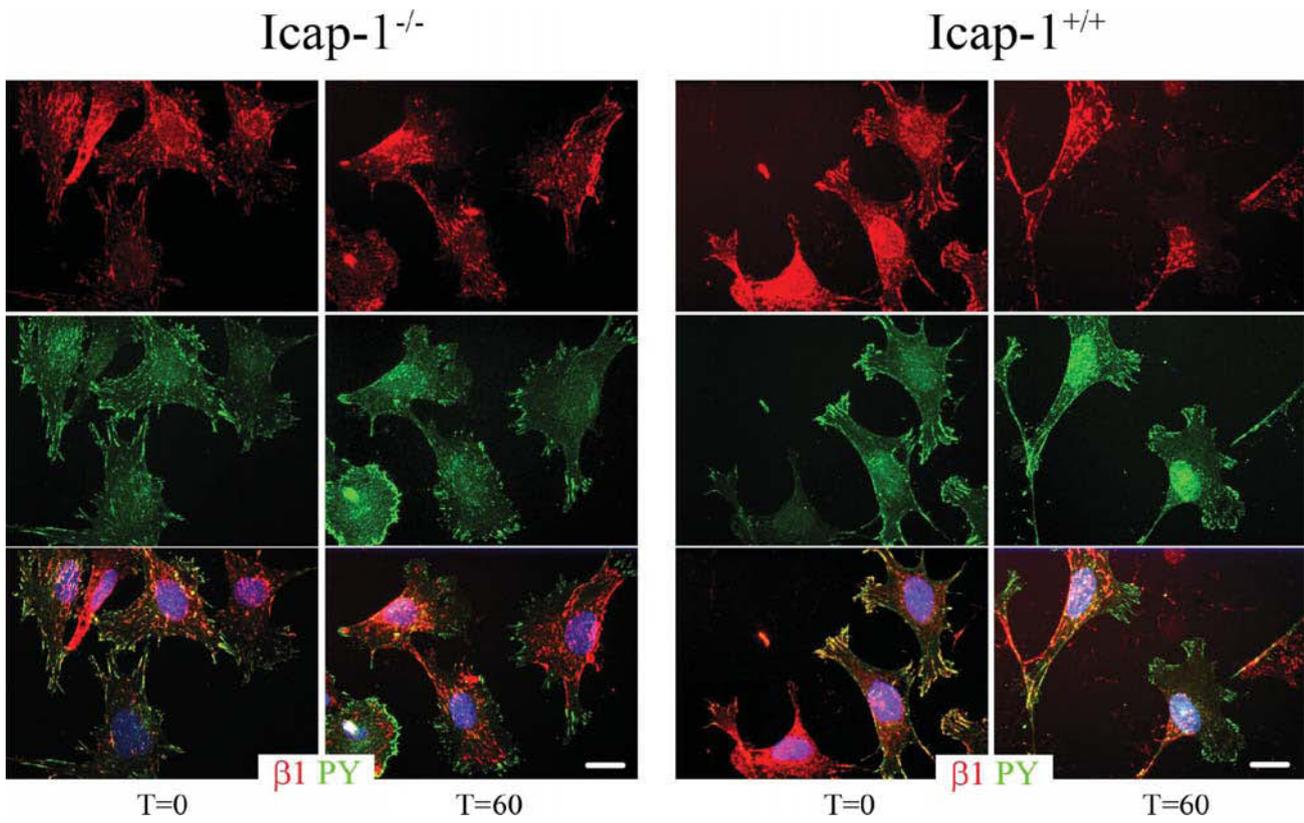


Figure S5. **Defect in the translocation of $\beta 1$ -containing fibrillar adhesion.** *Icap-1^{+/+}* and *Icap-1^{-/-}* cells were seeded on fibronectin-coated glass coverslips for 4 h. Live cells were incubated with 9EG7 anti- $\beta 1$ integrin antibody for 30 min at 4°C, and then, cells were either directly fixed (T = 0) or incubated at 37°C for an additional hour (T = 60). $\beta 1$ integrin localization was visualized by indirect immunofluorescence, phosphotyrosine (PY) labeling was used to visualize focal adhesion, and nuclei were stained using DAPI (blue). Bars, 10 μ m.

II. L'INTEGRINE $\beta 1$, REGULATEUR DE LA PROLIFERATION VIA L'ACTIVATION DU COFACTEUR DE TRANSCRIPTION YAP

II.1. Introduction

L'adhésion cellulaire à la matrice ou aux cellules environnantes joue un rôle clef dans les processus de prolifération, de différenciation et de survie cellulaires. L'adhésion cellulaire est donc un élément critique pour le développement et l'homéostasie tissulaire. Ainsi, des dérégulations de ce processus sont le plus souvent associées à des situations pathologiques et de nombreux gènes impliqués dans l'adhérence sont liés à des pathologies telles que des pertes d'homéostasie, l'inflammation ou la progression tumorale. Les intégrines sont les récepteurs majeurs de l'adhérence à la matrice extracellulaire mais peuvent aussi participer aux interactions cellule-cellule, elles sont donc des éléments clefs dans la régulation des grandes fonctions cellulaires.

La prolifération cellulaire : implication des facteurs de croissance et de l'adhérence.

La prolifération cellulaire est un processus très finement régulé dans lequel des facteurs mitogéniques, tels que ceux présents dans le sérum, activent des récepteurs présents à la surface cellulaire et stimulent des voies de signalisation canoniques telles que les voies MAPK/ERK et c-Jun N-terminal kinase (JNK). Il est maintenant clairement établi que l'adhésion cellulaire est un prérequis essentiel à la prolifération cellulaire, et la croissance indépendante de l'adhésion cellulaire représente une caractéristique de la transformation cellulaire (Stoker et al., 1968).

Il a été montré depuis longtemps que les intégrines étaient nécessaires à la pleine activité mitogène des facteurs de croissance (Streuli and Akhtar, 2009). N'ayant pas d'activité enzymatique propre, elles servent de plateforme de recrutement de molécules de signalisation impliquées dans la régulation de la prolifération. Divers travaux indiquent que les intégrines régulent de nombreuses voies de signalisation à différents niveaux. L'engagement des intégrines, par exemple, conduit au recrutement et à la phosphorylation de la focal associated kinase (FAK). FAK permet alors la formation

d'une plateforme pour différentes protéines clefs de la transduction ou pour des médiateurs activant les voies MAPK/ERK et JNK. FAK active aussi les kinases de la famille Src et les GTPases monomériques. FAK interagit avec l'adaptateur Shc, Grb2 et le facteur d'échange Sos conduisant finalement à l'activation de Ras et de la voie MAPK/ERK (Schlaepfer and Hunter, 1998). De plus, l'activation des intégrines conduit au recrutement des GTPases RAC1 et CDC42 sur la membrane plasmique, ce qui est à l'origine de l'activation des p21 activated kinases (PAKs) et donc indirectement de JNK. La perte d'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire induit une élévation transitoire de niveau d'AMP cyclique (AMPC) dans les cellules, activant ainsi la protéine kinase A (PKA) (Norambuena and Schwartz, 2011). L'augmentation d'activité de la PKA est corrélée à l'inhibition de PAK, et en aval de la voie des MAPK (Howe and Juliano, 2000). Ceci pouvant expliquer l'effet anti-prolifératif bien connu de PKA. D'un autre côté, les intégrines régulent la localisation nucléaire de ERK, contrôlant ainsi la phosphorylation et l'activation de sa cible ELK (Aplin et al., 2001). Ainsi, de nombreuses voies de signalisation sont modulées par les intégrines mais le rôle ainsi que le mode d'action des intégrines sur la prolifération cellulaire restent des phénomènes complexes à clarifier.

Les intégrines à chaîne $\beta 1$: acteurs majeurs du développement embryonnaire

La délétion constitutive du gène de l'intégrine $\beta 1$ chez la souris conduit à la perte de nombreux hétérodimères d'intégrines et est à l'origine d'une létalité embryonnaire (E5.5) péri-implantatoire due à un défaut dans la masse interne du blastocyste (Fassler and Meyer, 1995; Stephens et al., 1995). Ce modèle de knock-out (KO) constitutif de l'intégrine $\beta 1$ souligne le rôle essentiel de l'intégrine $\beta 1$ lors de l'embryogenèse, mais ne permet pas d'étudier la fonction de cette intégrine au cours des étapes plus tardives du développement ou dans des cellules différenciées telles que les ostéoblastes.

Le rôle *in vivo* de l'intégrine $\beta 1$ dans la formation et la fonction du tissu osseux a été abordé en 2008 par l'équipe du professeur Globus via l'étude d'un KO conditionnel de l'intégrine $\beta 1$ dans les ostéocytes corticaux (Phillips et al., 2008). Cette étude, basée sur l'analyse de souris dont le gène de l'intégrine a été délété grâce à l'utilisation de la recombinaison Cre exprimée sous le contrôle du promoteur du collagène de type I (Col

2.3), a pu montrer que la délétion de l'intégrine $\beta 1$ à ce stade ne provoquait pas de défaut de mise en place du tissu osseux. Toutefois, ce travail a mis en évidence le rôle des intégrines ostéocytaires comme mécanosenseurs nécessaires à la réponse du tissu osseux suite à la décharge des membres inférieurs. L'absence de phénotype fort observé chez ces KO conditionnels en conditions normales peut s'expliquer d'une part par la possibilité d'un phénomène de compensation par d'autres intégrines (ex : les intégrines à chaîne αv), d'autre part par une délétion trop tardive des intégrines $\beta 1$ au cours de la différenciation ostéoblastique ne permettant pas d'étudier leur rôle dans les phases plus précoces de la différenciation. Un autre modèle ciblant les ostéoblastes matures via l'utilisation du promoteur de l'ostéocalcine (OCN) permettant l'expression d'un dominant négatif de l'intégrine $\beta 1$ a démontré le rôle restreint de l'intégrine $\beta 1$ chez l'ostéoblaste mature (Globus et al., 2005; Zimmerman et al., 2000). En effet, le phénotype observé chez ces souris est seulement caractérisé par un léger défaut de prise de masse et une résistance osseuse réduite aux contraintes physiques.

Dans notre étude, nous avons voulu savoir comment les ostéoblastes intègrent les données environnementales afin de coordonner la formation et le remodelage osseux. Nous nous sommes donc intéressés au rôle de l'intégrine $\beta 1$ dans l'ostéogénèse précoce chez la souris. Pour cela nous avons étudié un modèle de souris dont le gène de l'intégrine $\beta 1$ a été délété dans les ostéoblastes en cours de maturation par l'utilisation de la recombinaison Cre exprimée sous le contrôle du promoteur du facteur de transcription ostérix (Osx-Cre). Nos résultats indiquent que la perte de l'intégrine $\beta 1$ affecte la prolifération cellulaire *in vivo* et *in vitro*. Dans un modèle cellulaire d'ostéoblastes cette prolifération est corrélée à une augmentation significative de la phosphorylation de YAP et à sa rétention cytoplasmique. De plus, alors que la réactivation de la voie MAPK/ERK dans les ostéoblastes déficients pour l'intégrine $\beta 1$ ne restaure pas la prolifération de ces cellules, l'expression de la forme non-phosphorylable de YAP la restaure complètement. La perte de l'intégrine $\beta 1$ conduit à une augmentation importante du niveau d'AMPc dans les ostéoblastes et nous avons pu montrer une corrélation entre le niveau d'AMPc cellulaire, la phosphorylation de YAP et sa localisation subcellulaire.

II.2. Résultats

Afin de comprendre le rôle de l'intégrine $\beta 1$ dans la formation et la fonction du tissu osseux, nous avons étudié le phénotype de souris dont le gène de l'intégrine $\beta 1$ a été délété dans les ostéoblastes en cours de différenciation via un système Cre-Lox. Nous avons pour cela croisé des souris « floxées » pour le gène de l'intégrine $\beta 1$ ($\beta 1^{f/f}$) avec des souris exprimant la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur du facteur de transcription ostérix et « floxées » pour un des deux allèles du gène de l'intégrine $\beta 1$ ($Osx-Cre + ; \beta 1^{+/f}$). Ces croisements nous ont donc permis d'obtenir trois populations de souris : des souris sauvages ($Osx-Cre - ; \beta 1^{+/f}$ ou $Osx-Cre - ; \beta 1^{f/f}$), des souris hétérozygotes ($Osx-Cre + ; \beta 1^{+/f}$) et des souris mutantes ($Osx-Cre + ; \beta 1^{f/f}$). Après avoir étudié le phénotype de ces souris, nous nous sommes attachés à comprendre les bases moléculaires des défauts observés *in vivo*. Pour cela, nous avons isolé une population de pré-ostéoblastes à partir de calvaires de souris « floxées » pour le gène de l'intégrine $\beta 1$ que nous avons ensuite immortalisée et dans laquelle nous avons délété ou non le gène de l'intégrine $\beta 1$ grâce à l'utilisation d'adénovirus permettant l'expression de la recombinaise Cre. Nous avons ensuite étudié et comparé ces deux populations cellulaires ($\beta 1^{f/f}$ et $\beta 1^{-/-}$) afin de mieux comprendre les bases moléculaires de l'implication de l'intégrine $\beta 1$ dans la prolifération ostéoblastique et cellulaire en général.

La délétion de l'intégrine $\beta 1$ dans l'ostéoblaste en cours de maturation est à l'origine d'une réduction de la dynamique osseuse associée à une fragilité importante du tissu osseux.

Afin de caractériser le rôle des intégrines à chaîne $\beta 1$ dans l'ostéogenèse, nous avons analysé le phénotype de souris KO conditionnel pour l'intégrine $\beta 1$ dans les ostéoblastes en cours de maturation ($Osx-Cre + ; \beta 1^{f/f}$). L'analyse du développement post-natal de ces souris révèle un défaut de croissance et de prise de poids important (Figure II.1.A. et B.). La différence entre la prise de poids des souris sauvages et mutantes s'observe à partir de P15, correspondant à la période de sevrage des portées. L'analyse des os longs de ces souris par micro-radiographie 3D (micro-computed tomography (μ CT)) révèle une diminution significative de la densité osseuse lors de la perte de l'intégrine $\beta 1$ (Figure II.1.C.). Cette réduction est associée à un défaut important de minéralisation des os longs

mais aussi des os plats tels que la calvaire et les omoplates (Figure II.1.D.). Contrairement aux souris sauvages, les souris mutantes présentent dès P3 des os très poreux avec dans certaines zones une absence quasi totale de minéralisation et des déformations des os longs. Nous avons aussi pu observer chez certains mutants des cales hypertrophiques dont l'origine pourraient être des fractures survenues lors de la mise bas ou au cours des premiers jours de la vie des souris (Figure II.1.E.). Afin de mieux caractériser ces défauts dans la mise en place du tissu osseux des souris mutantes, une analyse histomorphométrique a été réalisée. Il apparaît très clairement que le nombre d'ostéoblastes ainsi que la surface osseuse recouverte par les ostéoblastes sont fortement réduits chez les souris mutantes comparées aux souris contrôles (Figure II.1.G.). L'analyse des paramètres dynamiques tels que le taux d'apposition minérale (ou Mineral Apposition Rate, MAR) révèle une nette diminution de la dynamique du tissu osseux des souris mutantes (Figure II.1.F.). Ainsi, il apparaît clairement que l'intégrine $\beta 1$ est un déterminant essentiel de l'ostéogenèse, nécessaire à la formation et à la dynamique d'un tissu osseux minéralisé résistant aux contraintes physiques environnementales.

Figure II.1 : La délétion de l'intégrine $\beta 1$ dans les ostéoblastes en cours de maturation induit un défaut de croissance, une fragilité osseuse et une réduction de la dynamique osseuse chez la souris. **A.** Courbe de croissance de souris sauvages (Osx-Cre-), hétérozygotes pour l'intégrine $\beta 1$ (Osx-Cre+ ; $\beta 1^{+/f}$) et mutantes (Osx-Cre+ ; $\beta 1^{f/f}$). **B.** Photographie de souris d'un mois, délétées ou non pour l'intégrine $\beta 1$. **C.** Mesure de la longueur fémorale de souris sauvages, hétérozygotes ou mutantes (** : $p < 0,05$). **D.** et **E.** Marquage au rouge d'Alizarine (os minéralisé) et bleu d'Alcian (cartilage) de squelettes de souris sauvages ou mutantes de 3 jours (D.) et 15 jours (E.) avec présence de déformations des membres inférieurs et de cales de réparation de fractures costales chez les mutants à 15 jours. **F.** Densité osseuse totale (corticale et trabéculaire) de souris sauvages, hétérozygotes ou mutantes (** : $p < 0,05$). **G.** Visualisation de la vitesse d'apposition minérale par injection de colorants de la minéralisation chez les souris sauvages ou mutantes. La distance entre les deux fronts de coloration représentant l'épaisseur d'os minéralisé durant le temps (7 jours) écoulé entre les deux injections. **H.** et **I.** Analyse histomorphométrique de souris sauvages ou mutantes représentant le nombre d'ostéoblastes (H.) et la surface ostéoblastique (I.)(* : $p < 0.1$).

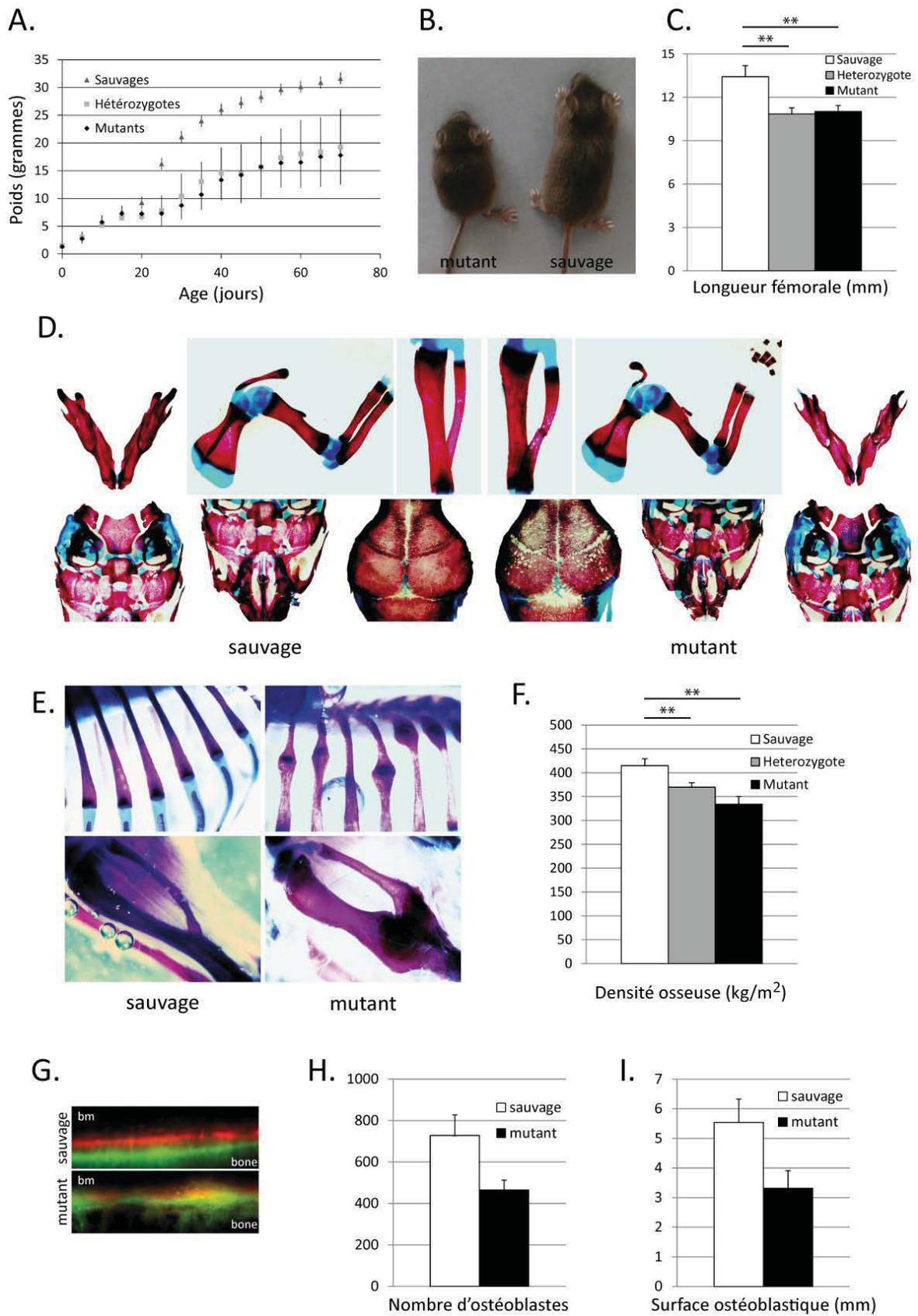


Figure II.1 : La délétion de l'intégrine $\beta 1$ dans les ostéoblastes en cours de maturation induit un défaut de croissance, une fragilité osseuse et une réduction de la dynamique osseuse chez la souris.

L'intégrine $\beta 1$ et le dialogue ostéoblaste-ostéoclaste.

Le dialogue entre ostéoblastes et ostéoclastes est un élément important pour l'homéostasie osseuse. En effet, un équilibre fin entre formation et résorption osseuses doit exister afin de maintenir une masse et une qualité osseuses suffisantes tout au long de la vie. Les ostéoblastes et ostéoclastes communiquent donc afin de contrôler respectivement leur prolifération, différenciation et activité. Ayant mis en évidence un important défaut fonctionnel des ostéoblastes dépourvus d'intégrine $\beta 1$, nous nous sommes demandé si ce dernier pouvait avoir une répercussion sur la population ostéoclastique chez les souris mutantes. Nous avons pour cela analysé par histomorphométrie la quantité d'ostéoclastes présents sur la surface osseuse de souris âgées d'un mois. Les souris mutantes présentent une diminution importante de leur nombre d'ostéoclastes accompagnée par une réduction de la surface osseuse recouverte par des ostéoclastes (Figure II.2.A. et B.). Ce déficit ostéoclastique a aussi été observé chez des souris plus jeunes. En effet, l'analyse de l'activité de la phosphatase alcaline résistante au tartrate (TRAP), un marqueur des ostéoclastes sur coupe histologique, a révélé que déjà, 4 jours après la naissance, la population ostéoclastique est affectée par le défaut fonctionnel des ostéoblastes (Figure II.2.C.). Les différences sont moins marquées au niveau de l'os cortical qu'au niveau de l'os trabéculaire, siège d'une dynamique osseuse beaucoup plus importante (Figure II.2.D.). Partant de ce constat, nous nous sommes demandé si la réduction de l'activité ostéoclastique chez les souris mutantes pouvait avoir un impact à plus ou moins long terme sur le phénotype osseux de ces souris. Afin de répondre à cette question, nous avons laissé vieillir des souris et nous avons ensuite analysé leur tissu osseux par μ CT. Avec l'âge, les souris mutantes présentent toujours une épaisseur corticale réduite (Figure II.2.E. panneau de gauche, carrés rouges). Toutefois et de manière surprenante, lorsque l'on s'intéresse à la zone trabéculaire, on peut observer une très nette augmentation des travées osseuses chez les souris mutantes âgées comparées aux animaux contrôles du même âge (Figure II.2.E. panneau de droite). Ainsi, la délétion de l'intégrine $\beta 1$ dans les ostéoblastes en cours de maturation n'induit pas seulement un défaut fonctionnel des ostéoblastes mais conduit aussi à une dérégulation importante de l'activité ostéoclastique et à une « compensation » partielle du phénotype « ostéoporotique » primaire.

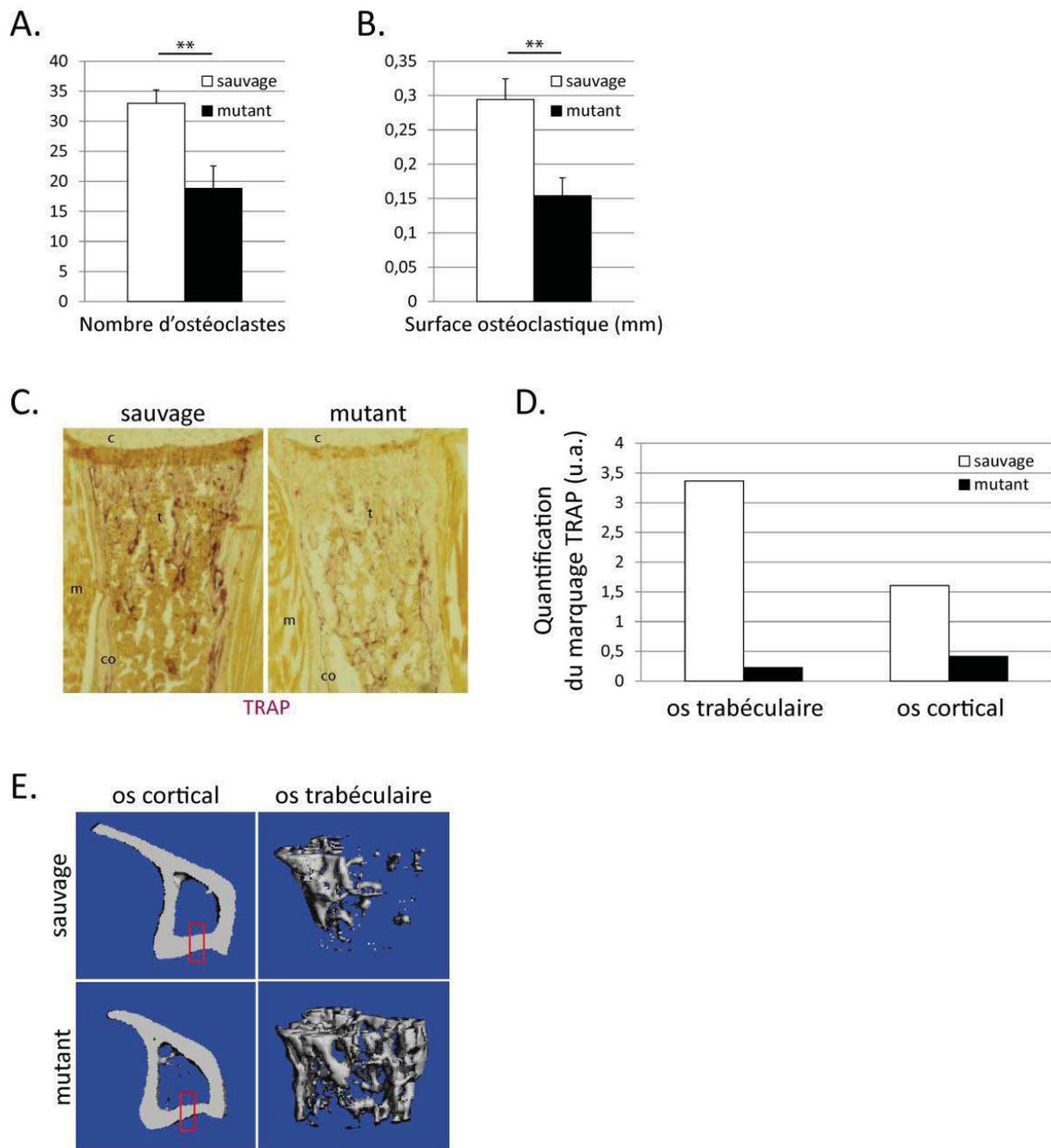
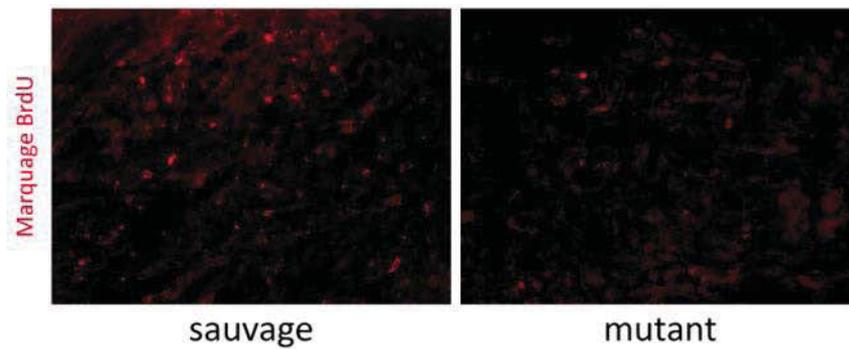


Figure II.2 : La délétion de l'intégrine $\beta 1$ ostéoblastique, impact sur le dialogue avec la lignée ostéoclastique. A. et B. Le nombre d'ostéoclastes et la surface osseuse recouverte par ces derniers ont été analysés par histomorphométrie chez des souris sauvages et mutantes âgées d'un mois. **C.** L'activité de la phosphatase alcaline résistante au tartrate (TRAP) reflétant la densité ostéoclastique, a été révélée sur des coupes histologiques de souris âgées de 4 jours (c : cartilage ; t : zone trabéculaire ; co : os cortical ; m : muscle). **D.** La surface osseuse positive au TRAP a été quantifiée au niveau de l'os trabéculaire et de l'os cortical grâce au logiciel ImageJ (u.a.: unité arbitraire). **E.** L'épaisseur corticale (panneau de gauche) et la densité de travées (panneau de droite) ont été étudiées sur des tibias des souris âgées de 1 an et demi par microtomographie (μ CT).

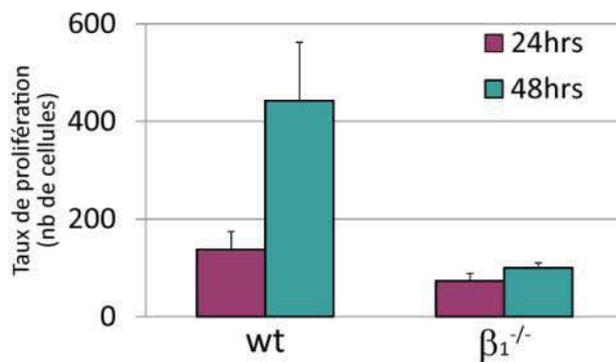
L'intégrine $\beta 1$, un élément déterminant de la prolifération ostéoblastique.

La densité d'ostéoblastes présents dans le tissu osseux est un élément dépendant de l'équilibre entre prolifération, apoptose et différenciation cellulaire. Afin de comprendre l'origine de la diminution importante du nombre d'ostéoblastes chez les souris mutantes, nous nous sommes intéressés à leur taux de prolifération. L'analyse de la prolifération ostéoblastique *in vivo* révèle une forte diminution de l'incorporation de BrdU chez les souris mutantes par rapport aux souris sauvages (Figure II.3.A.). Ainsi, la perte de l'intégrine $\beta 1$ induit un défaut de prolifération ostéoblastique important. Ces résultats ont été confirmés *in vitro* sur des lignées de pré-ostéoblastes isolés à partir de calvaires de souris « floxées » pour le gène de l'intégrine $\beta 1$, immortalisées et délétées ou non pour l'intégrine $\beta 1$ via l'utilisation d'un adénovirus exprimant la recombinaise Cre. En effet, les cellules dépourvues d'intégrine $\beta 1$ ($\beta 1^{-/-}$) présentent un taux de prolifération *in vitro* très faible (Figure II.3.B.). Il est admis depuis plusieurs années que les intégrines régulent la prolifération cellulaire via l'activation de voies de signalisation canoniques telles que la voie MAPK/ERK (Howe et al., 2002). Afin de savoir si le défaut de prolifération observé en l'absence d'intégrine $\beta 1$ pouvait être restauré par l'activation de la voie ERK, nous avons étudié la capacité proliférative de cellules délétées pour l'intégrine $\beta 1$, mais exprimant une forme constitutivement active de la protéine MEK ($\beta 1^{-/-}$ MEK Q56P), kinase en amont de ERK dans la voie des MAPK. L'expression de ce mutant induit une augmentation significative de la phosphorylation de ERK dans les cellules (Figure II.3.C.). Toutefois, cette réactivation de la voie ERK n'est pas suffisante pour restaurer la prolifération des cellules délétées pour l'intégrine $\beta 1$ (Figure II.3.D.).

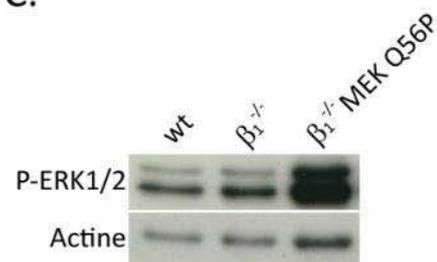
A.



B.



C.



D.

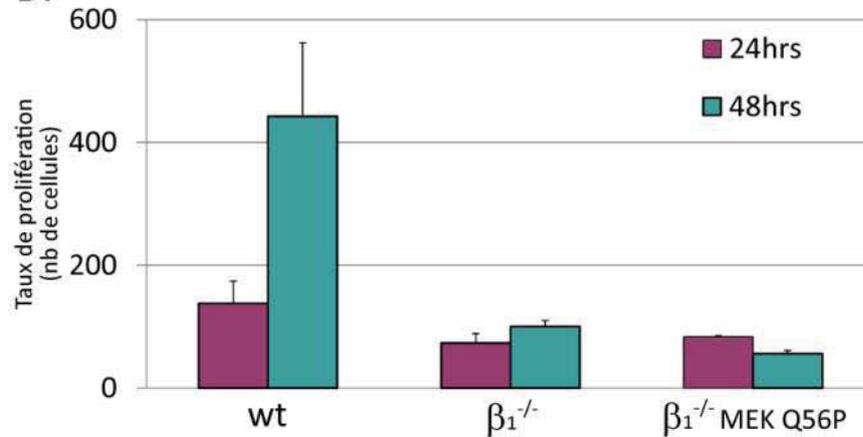


Figure II.3 : Les intégrines β_1 sont nécessaires à la prolifération ostéoblastique. A. Marquage par immunofluorescence de BrdU sur coupe de tibia de souris sauvages ou mutantes. B. Analyse du taux de prolifération de lignées de pré-ostéoblastes immortalisés sauvages (wt) ou délétés pour l'intégrine β_1 ($\beta_1^{-/-}$). C. Etude de la phosphorylation de ERK1/2 lors de l'expression d'un mutant constitutivement actif de MEK (MEK Q56P). D. Analyse du taux de prolifération de lignées de pré-ostéoblastes immortalisés sauvages (wt), délétés pour l'intégrine β_1 ($\beta_1^{-/-}$) ou délétés pour l'intégrine β_1 et exprimant une forme activée de la protéine MEK (MEK Q56P).

L'intégrine $\beta 1$ régule de la prolifération ostéoblastique via l'activation du cofacteur de transcription YAP.

Récemment, une nouvelle voie de signalisation régulant la prolifération cellulaire a été identifiée chez la drosophile, la voie Hippo. Bien que la fonction et la régulation exacte de chacun des constituants de cette voie soit encore sujet à débat, la voie canonique engage les kinases MST1/2 et LATS1/2 qui, lorsqu'activées en réponse à la confluence cellulaire, phosphorylent la Yes-associated protein (YAP) et le transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ) (Dong et al., 2007). YAP et TAZ sont deux co-activateurs transcriptionnels pour des facteurs de transcription tels que p73, RUNX2 et certaines protéines de la famille TEAD/TEF. Suite à leur phosphorylation par les kinases LATS1/2, YAP et TAZ sont séquestrés dans le cytoplasme par les protéines 14-3-3, inhibant ainsi leur accumulation nucléaire et leur effet pro-prolifératif. De plus, il a été montré récemment que la voie Hippo était régulée par les G-Protein coupled Receptors (GPCRs). Cette étude met en avant le lien existant entre la régulation de YAP et différents ligands extracellulaires (Yu et al., 2012). De plus, il a été proposé que YAP et TAZ soient des relais nucléaires des signaux mécaniques exercés par la rigidité de la matrice et la morphologie cellulaire (Dupont et al., 2011; Wada et al., 2011; Zhao et al., 2012). Enfin, de plus en plus de données semblent indiquer que YAP et TAZ seraient également régulés par l'adhésion cellulaire à la matrice extracellulaire et par la rigidité de cette matrice. En effet, des cellules cultivées sur des matrices de faible rigidité arrêtent de proliférer et leur niveau de phosphorylation de YAP et TAZ augmente (Dupont et al., 2011). Par ailleurs, l'expression d'une forme non-phosphorylable de YAP protège les cellules de l'anoïkis, mort cellulaire induite par la perte d'adhésion à la matrice (Hall et al., 2010), tandis que l'adhésion cellulaire conduit à une déphosphorylation importante de YAP (Zhao et al., 2012). Ces études ont montré que le réseau d'actine est un élément critique dans le contrôle de la phosphorylation de YAP. Cependant le mécanisme exact sous-tendant son action reste encore à élucider. Le rôle potentiel des intégrines dans le contrôle de la phosphorylation/déphosphorylation de YAP n'a pas réellement été exploré, ni la possibilité que des voies de signalisation en aval des intégrines puissent être impliquées.

Nous avons donc voulu savoir si la délétion de l'intégrine $\beta 1$ affectait l'activation de YAP. Pour ce faire, nous avons étudié la localisation subcellulaire de la protéine YAP par

immunofluorescence. La perte de l'intégrine $\beta 1$ induit une rétention cytoplasmique de la protéine YAP, alors que les cellules sauvages présentent une localisation de YAP majoritairement nucléaire (Figure II.4.A. B. et C.). L'intégrine $\beta 1$ est donc nécessaire à la translocation nucléaire de YAP. La régulation de la localisation de YAP est un phénomène complexe et de nouveaux acteurs et processus y prenant part sont découverts régulièrement. Entre autres, YAP est phosphorylé par les protéines kinases LATS1/2 sur 5 sites dont le mieux caractérisé est la sérine 127. Cette phosphorylation induit sa rétention cytoplasmique via sa séquestration par la protéine 14-3-3 (Oh and Irvine, 2008). Nous avons donc voulu savoir si le niveau de phosphorylation de la sérine 127 sur YAP était affecté par l'absence de l'intégrine $\beta 1$. L'analyse par western-blot de la phosphorylation de YAP dans les cellules en phase exponentielle de croissance montre clairement une augmentation de la phosphorylation de YAP (P-YAP) lors de la perte de l'intégrine $\beta 1$ (Figure II.4.D.). Le défaut d'activation de YAP dans les cellules dépourvues d'intégrine $\beta 1$ est confirmé par une diminution significative d'expression d'un des gènes cibles de YAP, le connective tissue growth factor (CTGF) (Figure II.4.E). Afin de déterminer si l'hyper-phosphorylation de YAP était responsable du défaut de translocation nucléaire de YAP dans les cellules n'exprimant pas l'intégrine $\beta 1$, nous avons ré-exprimé un mutant non phosphorylable de YAP (YAP-5SA) dans ces cellules. Ce mutant présente une localisation nucléaire malgré l'absence d'intégrine $\beta 1$ (Figure II.4.F. et G.). De plus, nous avons pu montrer que la relocalisation nucléaire de YAP via l'expression de ce mutant non-phosphorylable permet de restaurer l'expression du CTGF (Figure II.4.H.) et la prolifération des cellules dépourvues d'intégrine $\beta 1$ (Figure II.4.I.). Ces résultats placent donc YAP en aval de l'intégrine $\beta 1$ et semblent indiquer que l'intégrine $\beta 1$ régulerait la prolifération cellulaire en permettant la translocation nucléaire du cofacteur de transcription YAP.

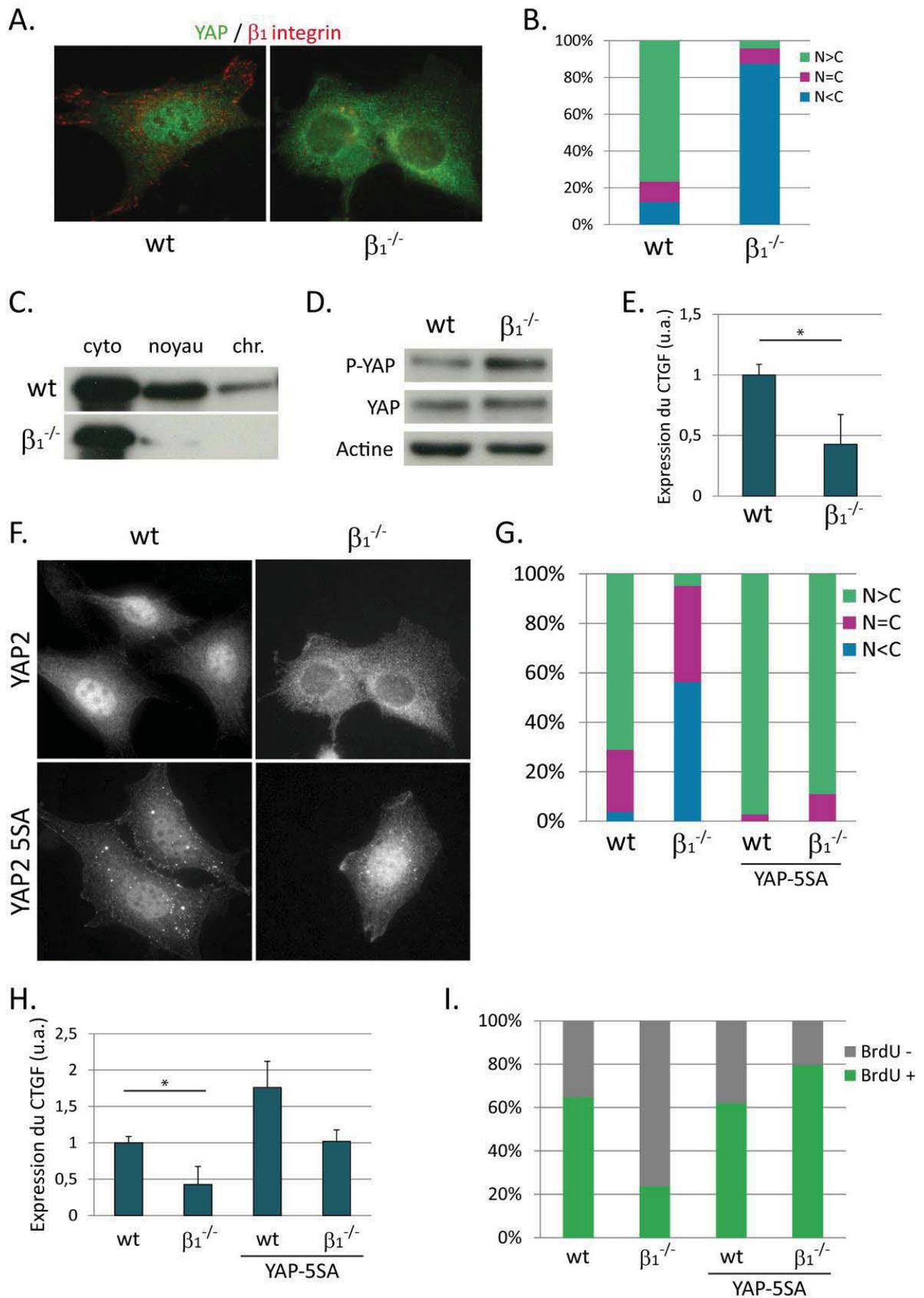


Figure II.4 : Les intégrines β_1 régulent la prolifération cellulaire par la régulation de l'activité et de la localisation de YAP.

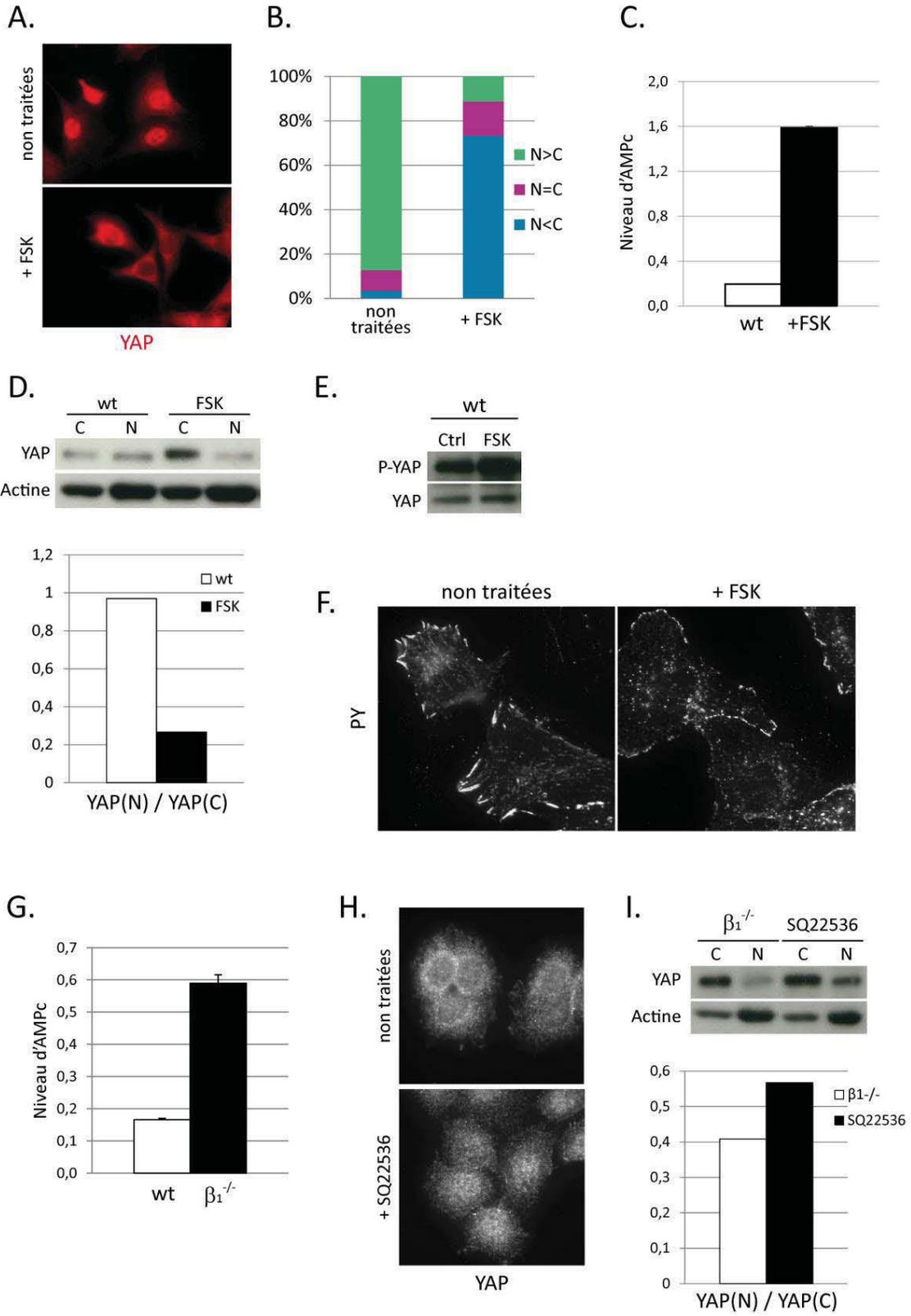
Figure II.4 : Les intégrines $\beta 1$ régulent la prolifération cellulaire par la régulation de l'activité et de la localisation de YAP. **A.** Les localisations de YAP et de l'intégrine $\beta 1$ dans les ostéoblastes sauvages (wt) ou délétés pour l'intégrine $\beta 1$ ($\beta 1^{-/-}$) ont été visualisées par immunofluorescence. **B.** Quantification du nombre de cellules dont la localisation de YAP est majoritairement nucléaire (N>C), autant nucléaire que cytoplasmique (N=C) ou majoritairement cytoplasmique (N<C). **C.** La localisation subcellulaire de YAP a été confirmée par fractionnement cellulaire et western-blot (cyto: fraction cytoplasmique ; noyau : fraction nucléaire soluble ; chr.: fraction liée à la chromatine). **D.** Le niveau de phosphorylation de YAP (Ser127) dans les cellules sauvages (wt) ou n'exprimant pas l'intégrine $\beta 1$ ($\beta 1^{-/-}$) a été étudié par western-blot. **E.** Le niveau d'expression du CTGF, gène cible de YAP, a été étudié par PCR quantitative et est exprimé en unité arbitraire (u.a.) (*: $p < 0,05$). **F.** La localisation subcellulaire de YAP (YAP) sauvage ou mutée pour ne pas être phosphorylable sur les 5 acides aminés ciblés par LATS1/2 (YAP-5SA) est visualisée par immunofluorescence. **G.** Quantification du nombre de cellules dont la localisation de YAP est majoritairement nucléaire (N>C), autant nucléaire que cytoplasmique (N=C) ou majoritairement cytoplasmique (N<C) selon l'expression de la forme sauvage ou non-phosphorylable de YAP. **H.** Le niveau d'expression du CTGF, a été étudié par PCR quantitative dans les lignées cellulaires exprimant ou non l'intégrine $\beta 1$ et exprimant ou non le mutant non phosphorylable de YAP (YAP-5SA) et est exprimé en unité arbitraire (u.a.) (*: $p < 0,05$). **I.** Analyse de la prolifération des cellules sauvages (wt) ou délétés pour l'intégrine $\beta 1$ ($\beta 1^{-/-}$) exprimant (YAP-5SA) ou non le mutant non phosphorylable de YAP.

La régulation du niveau d'AMP cyclique intracellulaire, lien entre l'intégrine $\beta 1$ et YAP ?

Nous avons finalement voulu savoir par quelle voie l'intégrine $\beta 1$ pouvait réguler la phosphorylation de YAP. Récemment, il a été montré que YAP est contrôlé par les GPCRs (Yu et al., 2012). De plus, la mise en suspension et la perte d'adhésion dépendante des intégrines sont à l'origine d'une augmentation du niveau d'AMPc via la relocalisation de la $G\alpha_s$ de zones de rafts lipidiques vers des zones non-rafts (Norambuena and Schwartz, 2011). Nous avons donc voulu savoir si la perte des intégrines $\beta 1$ pouvait réguler YAP via une voie dépendante de l'AMPc. Pour ce faire, nous avons traité des cellules sauvages avec de la forskoline (FSK), une molécule activatrice de l'adénylate cyclase, enzyme à l'origine de la synthèse d'AMPc. Le traitement des cellules sauvages à la forskoline délocalise YAP du noyau vers le cytoplasme (Figure II.5.A, B. et D.). Les mesures d'AMPc confirment bien l'effet activateur de la FSK sur l'adénylate cyclase et l'augmentation de l'AMPc suite à un traitement d'une heure (Figure II.4.C). Ainsi, les cellules sauvages traitées à la FSK et dont le niveau d'AMPc est élevé perdent la localisation nucléaire de YAP et présentent un phénotype semblable à celui des cellules dépourvues d'intégrine $\beta 1$. Cette relocalisation cytoplasmique de YAP est corrélée à une augmentation de sa phosphorylation (Figure II.5.E.), indiquant que la régulation de YAP par l'AMPc est un phénomène dépendant de sa phosphorylation. Afin de comprendre par quel biais la forskoline agissait sur la régulation de YAP, et sachant que la forskoline via l'activation de la protéin kinase A (PKA) régule négativement la formation des adhérences focales dépendantes de l'intégrine $\beta 1$ (Worth et al., 2010), nous nous sommes intéressés au

devenir des adhérences focales des cellules. En effet, il a été montré que la FSK, en activant la production d'AMPC régule la dynamique de l'actine et la formation des adhérences focales via une voie dépendante de la kinase Src et de la phosphorylation de la cavéoline (Swaney et al., 2006). Après une nuit d'adhérence sur verre, les cellules sauvages présentent un marquage phospho-tyrosine (PY) caractéristique avec présence d'adhérences focales (AF). Le traitement des cellules pendant 1 heure à la FSK induit une diminution de ces dernières (Figure II.5.F.). Deux hypothèses permettent d'expliquer ces résultats. Soit la forskoline et donc l'AMPC régulent YAP via la formation des plaques d'adhérence, soit l'intégrine $\beta 1$, en régulant l'AMPC, régule directement la phosphorylation de YAP. La question se pose donc de savoir qui de l'AMPC ou des intégrines est en aval de l'autre. Afin de déterminer si cette voie dépendante de l'AMPC était affectée dans les cellules dépourvues d'intégrine $\beta 1$, nous avons analysé le niveau d'AMPC dans ces cellules. Le dosage de l'AMPC révèle une augmentation significative de l'AMPC dans les cellules n'exprimant pas l'intégrine $\beta 1$ par rapport aux cellules sauvages (Figure II.5.G.). De plus, l'inhibition de l'adénylate cyclase par le SQ22536 dans les cellules dépourvues d'intégrine $\beta 1$ restaure en partie la localisation nucléaire de YAP (Figure II.5.H. et I.). Ces données semblent donc suggérer que l'AMPC serait en aval de l'intégrine $\beta 1$ dans la voie de régulation de YAP.

Figure II.5 : YAP est régulé d'une manière dépendante de l'AMPC. **A.** Analyse par immunofluorescence de la localisation de la protéine YAP dans des ostéoblastes sauvages traités (+FSK) ou non (non traités) à la forskoline pendant 1 heure. **B.** Quantification du nombre de cellules dont la localisation de YAP est majoritairement nucléaire (N>C), autant nucléaire que cytoplasmique (N=C) ou majoritairement cytoplasmique (N<C) selon que les cellules ont été traitées (+FSK) ou non (non traitées) à la forskoline pendant 1 heure. **C.** Analyse du niveau d'AMPC dans les cellules sauvages traitées (+FSK) ou non (wt) à la forskoline pendant 15 minutes. **D.** Analyse de la localisation subcellulaire de la protéine YAP par fractionnement cellulaire (C: fraction cytoplasmique; N: fraction nucléaire) et quantification du ratio de YAP nucléaire par rapport à la quantité de YAP cytoplasmique après traitement à la forskoline pendant 1 heure (FSK). **E.** Analyse du niveau de phosphorylation de YAP (Ser127) dans les cellules sauvages traitées à la FSK (FSK) ou non (Ctrl) pendant 1 heure. **F.** Etude de l'effet de la forskoline sur les plaques par immunomarquage de la phospho-tyrosine (PY) après 1 heure de traitement à la forskoline (+FSK). **G.** Dosage du niveau d'AMPC dans les cellules sauvages (wt) ou n'exprimant pas l'intégrine $\beta 1$ ($\beta 1^{-/-}$). **H.** Analyse par immunofluorescence de la localisation de la protéine YAP dans les cellules dépourvues d'intégrine $\beta 1$ après traitement d'une heure (SQ22536) ou non (non traitées) au SQ22536, inhibiteur de l'adénylate cyclase. **I.** Analyse de la localisation subcellulaire de la protéine YAP dans les cellules dépourvues d'intégrine $\beta 1$ par fractionnement cellulaire après traitement au SQ22536 (C: fraction cytoplasmique; N: fraction nucléaire) et quantification du ratio de YAP nucléaire par rapport à la quantité de YAP cytoplasmique.



II.3. Discussion

Cette étude a mis en évidence l'importance des intégrines à chaîne $\beta 1$ dans la régulation de la prolifération dépendante du cofacteur de transcription YAP. Nous avons montré que l'activation de la voie MAPK/ERK n'était pas suffisante à la restauration de la prolifération des cellules déficientes pour l'intégrine $\beta 1$. De plus, nos résultats indiquent que les intégrines $\beta 1$ régulent le niveau de phosphorylation de YAP, et par là même, la localisation subcellulaire de YAP dans les cellules. Nous avons pu corrélérer le niveau d'AMPc, élevé en absence de l'intégrine $\beta 1$, et la régulation de YAP. Enfin, l'impact du défaut ostéoblastique sur la population ostéoclastique met en avant l'importance du dialogue existant entre les populations ostéoblastiques et ostéoclastiques afin de maintenir l'homéostasie tissulaire et ouvre un certain nombre de questions concernant l'importance des intégrines et de la matrice extracellulaire dans ce dialogue.

II.3.1. Les intégrines $\beta 1$, YAP et la progression tumorale

Le cofacteur de transcription YAP a été caractérisé voilà quelques années comme étant un oncogène impliqué dans de nombreux cancers (Steinhardt et al., 2008). La voie Hippo, régulant négativement YAP, a été le sujet de nombreuses études l'identifiant comme une cible thérapeutique intéressante. Nous montrons ici que les intégrines à chaîne $\beta 1$ sont des régulateurs importants de l'oncogène YAP. L'implication des intégrines à chaîne $\beta 1$ dans les processus tumoraux est maintenant avérée. Divers travaux ont montré qu'elles étaient de mauvais pronostic dans de nombreux cancers (Dos Santos et al., 2012). Toutefois il est important de noter que selon la sous-unité α associée à l'intégrine $\beta 1$, l'effet de l'intégrine sur les comportements cellulaires est différent. Par exemple, la perte d'expression d' $\alpha 2\beta 1$ est corrélée à une capacité métastatique importante des cellules issues de cancer du sein soulignant l'effet suppresseur de tumeur de cette intégrine dans ce contexte (Zutter et al., 1995). A contrario, la surexpression des intégrines $\alpha 5\beta 1$ ou $\alpha 4\beta 1$ est associée à la progression tumorale dans de nombreux types de tumeurs (Desgrosellier and Cheresch, 2010). Etant donné le rôle de l'intégrine $\beta 1$ dans la régulation de l'oncogène YAP, il serait intéressant de savoir s'il y a une corrélation entre l'expression de l'intégrine $\beta 1$, l'activation de YAP et le devenir tumoral. Une étude est actuellement en cours en collaboration avec l'équipe

d'anatomo-pathologie du Dr Corinne Bouvier afin d'étudier la corrélation potentielle existant entre les niveaux d'expression de la protéine YAP et des intégrines $\beta 1$ qui sont associées à un facteur de mauvais pronostic dans l'ostéosarcome humain.

II.3.2. Les intégrines $\beta 1$, régulation de la prolifération et de l'apoptose

Les intégrines régulent la prolifération cellulaire via la régulation de voies de signalisation canoniques ainsi que par leur couplage aux récepteurs aux facteurs de croissance (Streuli and Akhtar, 2009). Dans notre modèle d'ostéoblastes, la sur-activation de la voie MAPK/ERK par l'expression du mutant constitutivement actif de MEK (MEK Q56P) ne permet pas de restaurer la prolifération des cellules dépourvues d'intégrine $\beta 1$ malgré le niveau de phosphorylation important de ERK1/2 dans ces conditions. L'activation constitutive de YAP via l'expression du mutant YAP-5SA permet, quant à elle, de restaurer cette prolifération. D'autres équipes ont montré que les intégrines régulaient la prolifération cellulaire via, entre autres, l'expression de la cycline D1 nécessaire à la progression dans le cycle cellulaire ou la répression de la protéine p21CIP (Li et al., 2005; Walker and Assoian, 2005). YAP pour sa part régule l'expression de gènes tels que la cycline E ou le connective tissue growth factor (CTGF) en coopération avec le facteur de transcription TEAD (Zhao et al., 2008). En bonne adéquation avec ces résultats, nous avons montré que l'expression du CTGF était réduite dans les cellules dépourvues d'intégrines $\beta 1$, confirmant le rôle de YAP dans la prolifération ostéoblastique dépendante de l'intégrine $\beta 1$. Il serait toutefois intéressant d'analyser l'expression d'autres protéines telles que les cyclines, cibles de YAP ou d'autres voies canoniques afin de déterminer l'implication de chacune de ces voies dans la prolifération dépendante de l'intégrine $\beta 1$.

Plusieurs études ont montré le rôle de YAP dans la régulation de l'apoptose. Etonnamment, YAP, qui est maintenant présenté comme un oncogène stimulant la prolifération cellulaire, présente aussi un effet pro-apoptotique. En effet, YAP stimule l'apoptose via la stabilisation de la protéine p73 (Levy et al., 2007). Cette fonction pro-apoptotique est régulée négativement par la phosphorylation de YAP par AKT (Basu et al., 2003). Il est intéressant de noter que les cellules dépourvues d'intégrine $\beta 1$

présentent un défaut de phosphorylation d'AKT, on pourrait donc s'attendre à ce qu'elles présentent une réduction de la phosphorylation de YAP, ce qui n'est pas le cas. Il semble donc que la voie de régulation de la phosphorylation de YAP par AKT soit marginale dans notre cas par rapport à une ou plusieurs autres voies de régulation. Une étude plus approfondie du niveau d'apoptose des cellules dépourvues d'intégrine $\beta 1$ ainsi que du statut de la protéine p73 devront être entreprises dans le futur.

II.3.3. Comment les intégrines $\beta 1$ régulent-elles l'activité de YAP ?

Depuis plusieurs années, de nombreux groupes de recherche se sont intéressés aux mécanismes à l'origine de la régulation du cofacteur de transcription YAP. Parmi les nombreux mécanismes caractérisés, on distingue les régulations dépendantes de la phosphorylation de YAP ou non. En effet, bien que la majorité des études s'intéressent aux mécanismes de phosphorylation et déphosphorylation de YAP, il semble que YAP puisse aussi être régulé de manière indépendante de sa phosphorylation. Par exemple, YAP en interagissant avec des protéines de la famille de l'angiomotin (AMOT) est séquestré dans le cytoplasme et son action pro-proliférative est inhibée (Zhao et al., 2011). Dans notre cas, la perte de l'intégrine $\beta 1$ induit une augmentation du niveau de phosphorylation de la sérine 127 de YAP, impliquée dans sa localisation subcellulaire. Cette augmentation peut-être due à une augmentation effective de la phosphorylation de la protéine YAP par une kinase ou à un défaut de déphosphorylation par une phosphatase.

La protéine phosphatase 2A (PP2A) régule la déphosphorylation de YAP. En effet, lors des interactions cellule-cellule, l' α -caténine séquestre YAP sous sa forme phosphorylée via l'interaction avec la protéine 14-3-3, empêchant ainsi son interaction et sa déphosphorylation par PP2A (Schlegelmilch et al., 2011). A l'inverse, lorsque les jonctions cellule-cellule sont perdues, YAP est libéré et déphosphorylé par PP2A. Il est intéressant de corréliser cette activité avec la stimulation de l'activité de PP2A par les intégrines $\alpha 2\beta 1$ (Ivaska et al., 2002). Bien que la régulation exacte de PP2A par les intégrines $\beta 1$ reste encore à élucider, une hypothèse séduisante pour expliquer l'effet de la perte des intégrines $\beta 1$ sur la phosphorylation de YAP pourrait être un défaut d'activation de la PP2A en absence d'intégrine $\beta 1$ conduisant à un défaut de

déphosphorylation de YAP. Une autre phosphatase pouvant être impliquée dans la déphosphorylation de YAP est la protéine phosphatase 1 (PP1). Il a récemment été montré que PP1 était régulée positivement par la signalisation des intégrines via l'activation d'un adaptateur moléculaire présent dans les adhérences focales, la phosphatase and actin regulator 4 (Phactr4)(Zhang et al., 2012). De plus, les données de protéomique sur les adhérences focales localisent ces deux phosphatases (PP1 et PP2A) dans les adhérences focales, appuyant l'hypothèse selon laquelle les intégrines pourraient les réguler toutes deux (Kuo et al., 2011). Ainsi, bien que nous n'ayons pas encore identifié la phosphatase responsable de la déphosphorylation de YAP induite par les intégrines à chaîne $\beta 1$, plusieurs phosphatases régulées par les intégrines s'avèrent être des candidats intéressants. Dans notre étude, nous avons pu mettre en évidence un lien entre la destruction des adhérences focales par la forskoline, la phosphorylation de YAP et la perte de sa localisation nucléaire. Ainsi, les adhérences focales en formant des plateformes pour le recrutement de molécules telles que des phosphatases pourraient réguler la déphosphorylation de YAP.

La phosphorylation de YAP peut, elle-aussi, être régulée activement. En effet, des cellules mises en suspension présentent une rapide phosphorylation de YAP, phénomène régulant probablement en partie l'arrêt de croissance cellulaire lors de la perte d'adhérence cellulaire (données non présentées). Lors de la mise en suspension cellulaire, les adhérences focales sont détruites, or ces structures jouent également un rôle important dans la régulation de l'endocytose des rafts. De fait, dans les cellules adhérentes, les clusters d'intégrines séquestrent la cavéoline sous sa forme phosphorylée, limitant ainsi l'endocytose des rafts lipidiques (del Pozo et al., 2005). De plus, dans les kératinocytes, la formation des cavéoles au niveau de la membrane plasmique semble être un processus dépendant de la formation d'un complexe entre l'intégrine $\beta 1$ et l'integrin-linked kinase (ILK) (Wickstrom et al., 2010). Nous nous sommes donc intéressés au rôle de l'endocytose des rafts lipidiques dans le contrôle de la phosphorylation de YAP. Des résultats préliminaires obtenus en inhibant l'endocytose lors de la mise en suspension cellulaire semblent indiquer que le phénomène d'endocytose est impliqué dans la phosphorylation de YAP (données non montrées). En outre, l'AMPc en activant la kinase Src peut stimuler la phosphorylation de la cavéoline (Swaney et al., 2006), reliant ainsi la signalisation dépendante de l'AMPc, l'endocytose des rafts lipidiques et la phosphorylation de YAP. Cette hypothèse est confortée par

l'analyse de cellules exprimant une forme activée de Src. En effet, ces cellules présentent un niveau de phosphorylation de YAP plus important que les cellules contrôles (données non montrées). A l'inverse, les cellules n'exprimant pas les trois kinases Src, Yes et Fyn semblent être plus résistantes à l'effet de la forskoline sur la phosphorylation de YAP (données non montrées). Ainsi, l'AMPC en régulant la voie Src permettrait l'endocytose des rafts et la phosphorylation de YAP (Figure II.6). De nombreuses études *in vivo* et *in vitro* ont permis de caractériser la cavéoline comme étant un suppresseur de tumeur (Williams and Lisanti, 2005). Les souris dépourvues de cavéoline-1 présentent une croissance tumorale accélérée d'environ 10 fois par rapport à des souris sauvages dans un modèle de tumeurs cutanée induites. Une explication pour ce phénomène pouvant être un défaut de phosphorylation et donc d'inactivation de YAP en absence de cavéoline.

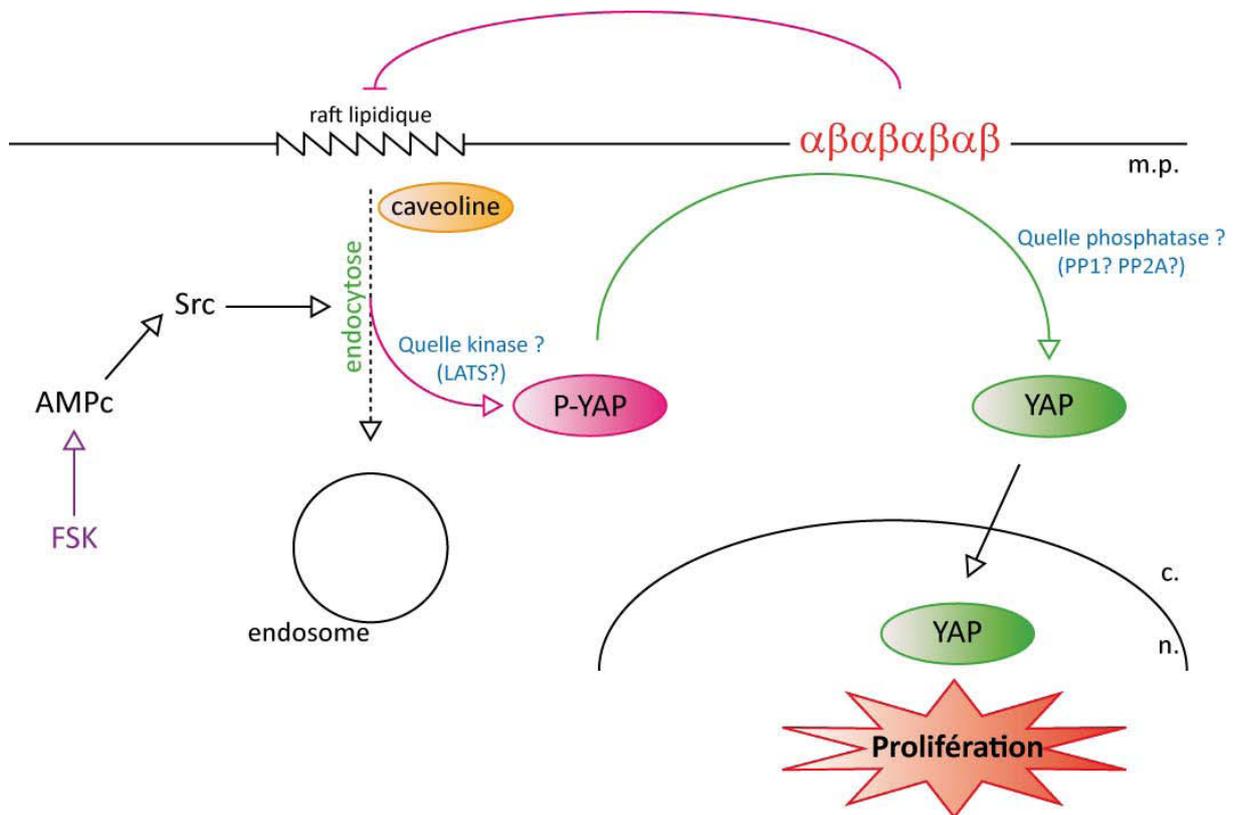


Figure II.6 : Modèle de régulation de la protéine YAP. La protéine YAP serait phosphorylée lors de l'endocytose des rafts dépendante de la cavéoline par une kinase restant encore à déterminer. L'endocytose des rafts est un processus dépendant du niveau d'AMPC via la kinase Src. La protéine YAP phosphorylée (P-YAP) serait déphosphorylée au niveau des plaques d'adhérences dépendantes des intégrines, la formation de ces plaques d'adhérence ayant un effet inhibiteur sur l'endocytose des rafts lipidiques. Une fois déphosphorylée, la protéine YAP est transloquée vers le noyau où elle stimule la prolifération. Le traitement à la forskoline (FSK) permet de stimuler la synthèse d'AMPC et l'endocytose dépendante de Src (m.p.: membrane plasmique ; c.: cytoplasme ; n.: noyau).

Ainsi, bien que nos résultats soient à confirmer, la perte des intégrines $\beta 1$ pourrait être à l'origine d'une augmentation de la phosphorylation de YAP via l'augmentation de l'endocytose des rafts lipidiques. Il reste maintenant à déterminer quelle kinase est impliquée dans ce processus actif de phosphorylation. En effet, plusieurs kinases sont capables de phosphoryler YAP. Entre autres, les kinases LATS1/2 impliquées dans la voie Hippo phosphorylent YAP en réponse à de nombreux stimuli. La voie Hippo est activée par des pseudos cadhérines en réponse aux interactions cellule-cellule, mais aussi par les GPCRs et la remise en suspension (Dong et al., 2007; Yu et al., 2012). De même, la kinase AKT semble aussi réguler la phosphorylation de YAP. Il sera donc intéressant d'étudier les rôles respectifs de ces différentes kinases dans la phosphorylation de YAP dépendante du processus d'endocytose.

II.3.3. Le dialogue ostéoblaste/ostéoclaste, quel rôle pour les intégrines ?

La perte de l'intégrine $\beta 1$ dans les ostéoblastes en cours de maturation induit, en plus du défaut fonctionnel des ostéoblastes, un défaut ostéoclastique important. La différenciation et la fonction des ostéoclastes sont régulées à la fois par les ostéoblastes matures et les ostéocytes. Dans notre étude, nous avons mis en évidence un défaut majeur des ostéoblastes matures. Toutefois, nous n'avons pas analysé en détail la fonction ostéocytaire chez nos souris mutantes. Nous ne pouvons donc pas exclure un impact de la perte de l'intégrine $\beta 1$ sur cette fonction et donc sur la régulation des ostéoclastes par les ostéocytes. En effet, les précédentes études du rôle des intégrines $\beta 1$ *in vivo* ont pu mettre en évidence leur implication comme mécanosenseurs nécessaires à la réponse du tissu osseux suite à la décharge des membres inférieurs (Phillips et al., 2008). Le dialogue entre ostéoblastes et ostéoclastes est principalement basé sur deux cytokines, le RANK ligand (RANKL) activateur de la différenciation et de la fonction ostéoclastique, et l'ostéoprotégérine (OPG) ayant l'effet inverse. Des résultats préliminaires obtenus *in vitro* semblent indiquer que l'équilibre entre ces deux cytokines n'est pas affecté par la perte de l'intégrine $\beta 1$. Bien que ces résultats restent à confirmer, il semblerait que la dérégulation des ostéoclastes dans notre système ne dépende pas d'une altération de ces deux cytokines. La dégradation de la matrice par les ostéoclastes est régulée en partie par l'état de minéralisation de cette dernière. En effet,

une matrice minéralisée va stimuler la fonction ostéoclastique. A l'inverse, on peut imaginer qu'une matrice osseuse faiblement minéralisée inhibera l'activité ostéoclastique. Ceci pourrait expliquer pourquoi, chez nos souris présentant un défaut fonctionnel des ostéoblastes et donc un faible niveau de minéralisation, la fonction ostéoclastique est compromise.

III. L'INTEGRINE $\beta 1$, UN COMMUTATEUR DE LA FONCTION OSTEOBLASTIQUE

III.1. Introduction

Bien que l'origine exacte des cellules formant l'os soit encore un sujet de débat, il est maintenant clair qu'une population de cellules souches ou ostéoprogéniteurs est essentielle à la formation, à l'homéostasie et au renouvellement osseux. Initialement, ces cellules doivent proliférer puis ralentir leur prolifération afin de se différencier pleinement, devenir fonctionnelles et déposer les protéines de la matrice extracellulaire. Cette dernière étape de différenciation est caractérisée par l'expression de marqueurs tels que RUNX2, ostérix (Osx), la phosphatase alcaline (ALP) et le collagène de type I (Col I). Il est maintenant bien établi que des facteurs solubles tels que l'IGF, le VEGF ou le parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) sont importants pour la prolifération cellulaire et l'engagement des précurseurs. De plus, les propriétés physiques et biochimiques du microenvironnement matriciel sont aussi des facteurs importants dans ce processus. Ainsi, des facteurs solubles tels que les BMPs et les WNTs coopèrent avec la matrice extracellulaire afin de permettre la différenciation et la fonctionnalisation des ostéoblastes.

Les intégrines et la différenciation ostéoblastique

Diverses études réalisées *in vivo* et *in vitro* ont mis en évidence le rôle des intégrines et du microenvironnement dans la différenciation ostéoblastique. Les propriétés physiques et la nature du microenvironnement influencent la différenciation ostéoblastique de manière importante. Ainsi, la rigidité de la matrice, via l'activation de la voie RhoA/ROCK et, en aval, de la signalisation ERK conduit à l'augmentation de l'activité de Runx2 et l'expression de ses gènes cibles nécessaires à l'ostéogenèse (Khatiwala et al., 2009). L'activation de la voie ERK par les intégrines en réponse aux contraintes de cisaillement générées par des mouvements de fluides ou "fluid shear stress" régule non seulement l'activité de Runx2 mais aussi l'expression de l'intégrine $\beta 1$ et de la BMP-2 via NF κ B. Ceci génère une boucle d'amplification augmentant l'expression des gènes nécessaires à l'ostéogenèse (Liu et al., 2012).

Parmi les intégrines décrites comme jouant un rôle important dans l'ostéogenèse, l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ a été une des premières et des mieux étudiées. En effet, l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$, récepteur majeur de la fibronectine, est indispensable à l'adhérence, la survie et la différenciation ostéoblastique (Damsky, 1999; Dufour et al., 2007). La stimulation de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ par un peptide agoniste promeut la survie et stimule la différenciation ostéoblastiques via l'activation de FAK et de la voie MAPK/ERK (Beraud-Dufour et al., 2007). *In vivo*, différentes études ont également tenté d'élucider le rôle des intégrines $\beta 1$ dans la différenciation ostéoblastique. Ainsi, l'expression d'un dominant négatif de l'intégrine $\beta 1$ dans les ostéoblastes matures (sous le contrôle du promoteur de l'ostéocalcine) induit un phénotype très léger, caractérisé par une légère diminution de la densité osseuse corticale chez les souris qui est très vite compensée dans le temps (Globus et al., 2005; Zimmerman et al., 2000). Il est intéressant de noter que ces mêmes souris soumises à une décharge des membres postérieurs présentent une augmentation significative de la réponse ostéoclastique comparées aux souris sauvages (Iwaniec et al., 2005). Ceci souligne l'importance des intégrines, et principalement de l'intégrine $\beta 1$ dans le dialogue entre ostéoblastes et ostéoclastes. En outre, l'expression de chacun des composants de l'hétérodimère $\alpha 5 \beta 1$ est régulée positivement dans les ostéoblastes par différents facteurs anaboliques tels que les œstrogènes (Yeh et al., 2010), le TGF- β (Nesti et al., 2002) ou encore le facteur de transcription induit par la BMP-2 forkhead box protein C2 (FOXC2)(Park et al., 2011).

D'autres intégrines que $\alpha 5 \beta 1$ participent à l'ostéogenèse. Par exemple l'intégrine $\alpha 2$ en activant ROCK, FAK et ERK promeut la différenciation ostéogénique de cellules souches mésenchymateuses (Shih et al., 2011). L'intégrine $\alpha \nu \beta 3$ pour sa part est nécessaire à l'induction de la différenciation ostéoblastique en réponse à la BMP-2 *in vitro* (Su et al., 2010), soulignant le lien entre signalisation intégrine et signalisation dépendante des facteurs de croissance.

Dialogue entre la voie BMP/Smad et les intégrines

Le lien entre la signalisation BMP-2 et les intégrines est maintenant bien caractérisé. Un certain nombre d'études, principalement réalisées *in vitro*, ont montré que la signalisation intégrine régulait positivement l'expression de la BMP-2. Ainsi les intégrines $\alpha v\beta 3$ et $\alpha 2\beta 1$ en activant la voie ERK permettent l'expression de la BMP-2 et donc la différenciation ostéoblastique par une boucle paracrine (Lu and Zreiqat, 2010). A l'inverse, le traitement d'ostéoblastes par la BMP-2 conduit à une augmentation de l'expression de l'intégrine $\beta 1$ qui favorise à son tour la prolifération et la survie ostéoblastiques via l'activation des voies AKT et MAPK/ERK (Park et al., 2011). De plus, les intégrines semblent réguler directement la signalisation BMP-2 au niveau même du récepteur ou des voies en aval. Ainsi, les forces de cisaillement induites par les mouvements de fluides, en permettant le regroupement des intégrines, activent la signalisation des récepteurs aux BMPs de manière indépendante de la BMP-2 (Chang et al., 2008). De même, l'utilisation d'anticorps bloquants les intégrines αv , $\alpha 1$ et/ou $\alpha 2$ ou bloquant le collagène de type I sont à l'origine de l'abolition de la signalisation en aval des récepteurs à la BMP-2 (Jikko et al., 1999; Lai and Cheng, 2005). Les intégrines agissent donc à différents niveaux pour réguler la signalisation dépendante de la BMP-2 et par conséquent la différenciation ostéoblastique.

Dans cette troisième partie, et après avoir montré que les intégrines à chaîne $\beta 1$ étaient des déterminants de la prolifération ostéoblastique dépendant du cofacteur YAP, nous avons voulu déterminer leur implication dans la différenciation et la fonction ostéoblastiques. En effet, l'analyse phénotypique des souris KO conditionnel de l'intégrine $\beta 1$ a révélé en plus du défaut de prolifération un défaut important de la fonction ostéoblastique. Nous avons ainsi pu mettre en évidence *in vivo* et *in vitro* que la perte de l'intégrine $\beta 1$ affecte la réponse des cellules à la BMP-2, facteur de différenciation majeur de l'ostéoblaste. De manière surprenante, cette régulation de la voie BMP par les intégrines à chaîne $\beta 1$ ne se fait pas au niveau du récepteur de la BMP-2 mais plutôt au niveau transcriptionnel.

III.2. Résultats

La perte de l'intégrine $\beta 1$ induit un défaut fonctionnel des ostéoblastes *in vivo* et *in vitro*.

Après avoir mis en évidence le rôle des intégrines à chaîne $\beta 1$ dans la prolifération des précurseurs ostéoblastiques, nous nous sommes intéressés au rôle de ces mêmes intégrines dans la fonction des ostéoblastes. Pour cela, nous avons tout d'abord analysé l'efficacité de délétion de l'intégrine $\beta 1$ par le système Cre/Lox chez nos souris. L'analyse immunohistologique ainsi que l'étude du niveau d'expression de l'intégrine $\beta 1$ dans des lysats d'os longs issus de souris âgées d'un mois révèle que la délétion de l'intégrine $\beta 1$ n'est pas totale (Figure II.1.A et B). Ceci peut s'expliquer par la présence dans les lysats de contaminants (moelle osseuse, fibres musculaires ...) autres que les cellules de la lignée ostéoblastique, ou par la présence de cellules de la lignée ostéoblastique non encore délétées du fait de leur engagement en différenciation insuffisant. En effet, les précurseurs ostéoblastiques n'exprimant pas encore le facteur de transcription Ostérix ne doivent pas présenter de délétion du gène de l'intégrine $\beta 1$. Toutefois, nous avons observé un phénotype osseux important chez nos souris mutantes (voir Figure II.1). Nous nous sommes donc attachés à étudier la capacité des cellules dépourvues d'intégrine $\beta 1$ à déposer une matrice de collagène de type I *in vivo*. En effet, la fonction première de l'ostéoblaste mature est d'organiser une matrice organique principalement composée de collagène de type I puis d'induire sa minéralisation par l'expression de protéines telles que la phosphatase alcaline (ALP). L'analyse immunohistologique de coupes d'os long d'embryons de souris (E14.5) nous a permis de mettre en évidence un défaut important de dépôt de la matrice de collagène de type I chez les souris mutantes (Figure III.1.C.). Ce défaut d'organisation de la matrice de collagène de type I a aussi pu être observé chez les lignées cellulaires dépourvues d'intégrine $\beta 1$ et induites en différenciation *in vitro*. En effet, au cours de leur différenciation en milieu ostéogénique, les ostéoblastes sauvages synthétisent et assemblent une matrice de collagène de type I qu'ils minéralisent ensuite via l'expression de la phosphatase alcaline (Figure III.1.D et E.). Les cellules dépourvues d'intégrine $\beta 1$ forment une matrice beaucoup moins dense de collagène de type I et présentent une absence totale de minéralisation à 15 jours de différenciation (Figure III.1.D et E.). Ce défaut fonctionnel observé chez les ostéoblastes lors de la perte de l'intégrine $\beta 1$ se caractérise aussi par une diminution de l'expression de l'ostéocalcine (OCN), marqueur de l'activité ostéoblastique, *in vivo* (Figure III.1.F.).

L'ensemble de ces données indique donc que l'intégrine β_1 est un élément important pour la fonction ostéoblastique *in vivo* et *in vitro*.

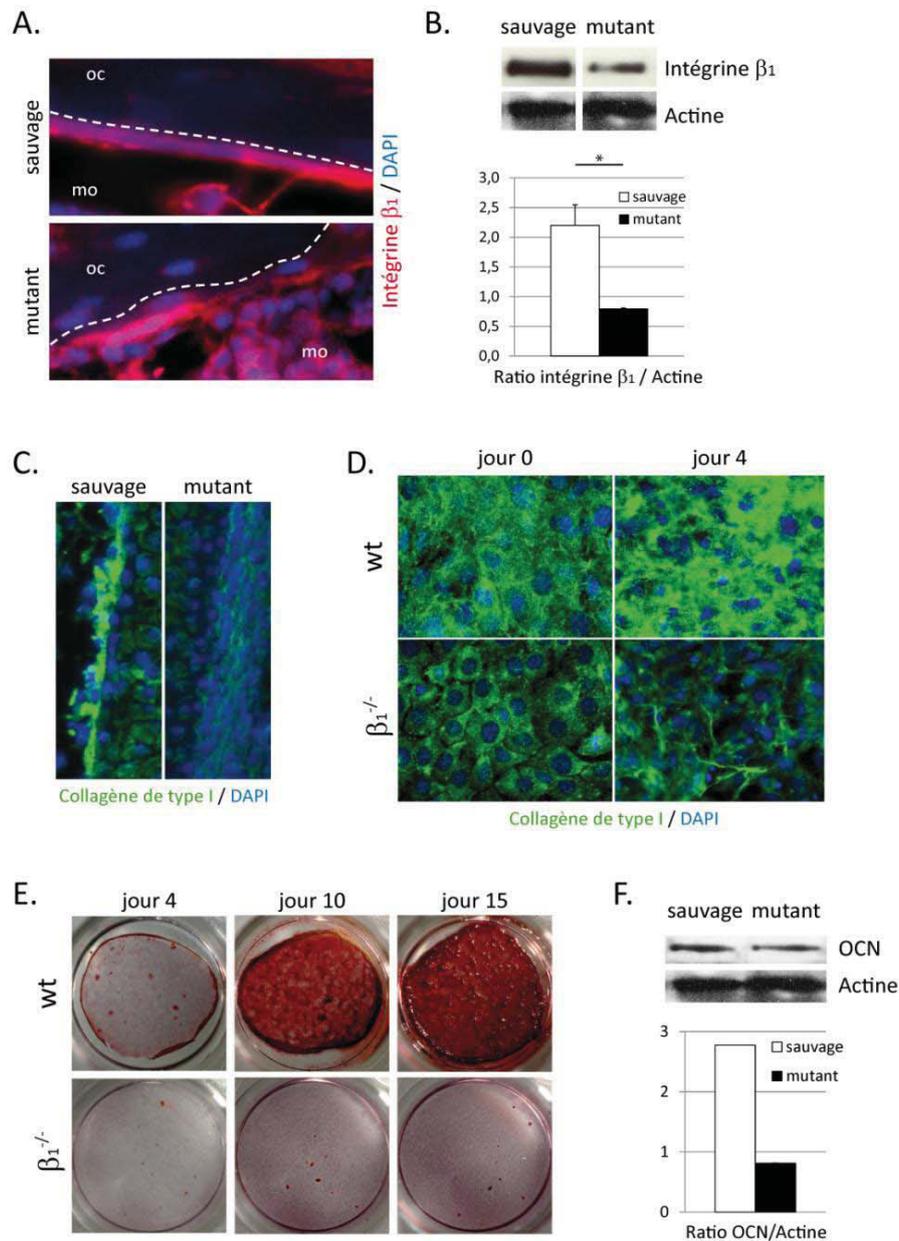


Figure III.1 : La délétion de l'intégrine β_1 dans les ostéoblastes en cours de maturation induit un défaut fonctionnel de ces derniers. **A.** L'expression de l'intégrine β_1 chez des souris sauvages (Osx-Cre-) ou mutantes (Osx-Cre+ ; $\beta_1^{f/l}$) de 4 jours (P4) a été analysée par immunohistologie. **B.** La délétion a été confirmée par western-blot et quantification du niveau d'expression de l'intégrine β_1 dans des lysats issus d'os longs de souris âgées d'un mois, sauvages ou mutantes. **C.** L'organisation de la matrice de collagène de type I a été étudiée par immunohistologie sur coupes d'embryons (E14.5) de souris sauvages ou mutantes. **D.** Ces résultats ont été confirmés *in vitro* par la réalisation d'immunomarquages de la matrice de collagène de type I sur ostéoblastes exprimant (wt) ou non ($\beta_1^{-/-}$) l'intégrine β_1 à confluence (jour 0) ou induits en différenciation durant 4 jours (jour 4). **E.** La capacité de minéralisation de cultures d'ostéoblastes exprimant (wt) ou non ($\beta_1^{-/-}$) l'intégrine β_1 et dont la différenciation a été induite en milieu ostéogénique durant 4, 10 et 15 jours a été étudiée par test de minéralisation au rouge d'Alizarine. **F.** L'expression de l'ostéocalcine (OCN) dans des lysats issus d'os longs de souris âgées d'un mois, sauvages ou mutantes a été réalisée par western-blot.

L'intégrine $\beta 1$ régulateur de la voie BMP-2 / SMAD1/5/8 en aval de la phosphorylation des SMADs.

Un des facteurs ostéogéniques majeurs régulant la fonction ostéoblastique et l'expression de gènes tels que la phosphatase alcaline, l'ostéocalcine, ou encore ostéix, est la BMP-2. La signalisation BMP-2 et la signalisation intégrine étant interdépendantes, nous avons voulu savoir si la perte de l'intégrine $\beta 1$ dans les ostéoblastes en cours de maturation pouvait affecter leur réponse à la BMP-2. La voie canonique de signalisation en aval des récepteurs à la BMP-2 passe par l'activation par phosphorylation des protéines SMAD1 et SMAD5. Ces protéines, une fois phosphorylées vont interagir avec une co-SMAD (SMAD4) et transiter vers le noyau où elles vont permettre la transcription de leurs gènes cibles. Afin d'étudier la fonctionnalité de cette voie *in vivo* chez nos souris mutantes, nous avons réalisé des immunomarquages de la forme phosphorylée des SMADs 1, 5 et 8 sur coupes histologiques. Cette analyse nous a permis de mettre en évidence une diminution significative de la phosphorylation des SMADs dépendantes de la BMP-2 lors de la perte de l'intégrine $\beta 1$ (Figure III.2.A.). En effet, nous pouvons observer sur ces immunofluorescences que les cellules n'exprimant pas l'intégrine $\beta 1$ sont les mêmes qui présentent un faible marquage P-Smad1/5/8. Ces résultats ont été confirmés par l'analyse en western-blot du niveau de phosphorylation des mêmes SMADs dans des lysats issus des os longs de souris sauvages ou mutantes (Figure III.2.B.). L'activation de la voie BMP/SMAD semble donc être affectée par la perte de l'intégrine $\beta 1$. Afin d'étudier plus en détail le lien entre l'intégrine $\beta 1$ et cette voie ostéogénique majeure, nous avons réalisé une série d'expériences *in vitro* sur des lignées ostéoblastiques sauvages (wt) ou délétées pour le gène de l'intégrine $\beta 1$ ($\beta 1^{-/-}$) que nous avons traitées à la BMP-2. De manière inattendue, le traitement des cellules par de la BMP-2 recombinante induit une phosphorylation des SMAD1/5/8 tout aussi importante chez les cellules n'exprimant pas l'intégrine $\beta 1$ que chez les cellules sauvages (Figure III.2.C.). De même l'activation de la voie de signalisation p38/MAPK, voie non canonique dépendante de la BMP-2, ne semble pas affectée par la perte de l'intégrine $\beta 1$ (Figure III.2.C.). Il semble donc que le défaut d'activation de la voie BMP/SMAD observé *in vivo* ne soit pas un effet « cellule autonome », mais plutôt lié à un environnement cellulaire moins riche en BMP-2. Une autre explication pourrait être que les cellules *in vitro* ont la

possibilité d'engager d'autres intégrines que $\beta 1$, par exemple les intégrines αv , compensant ainsi la perte de l'intégrine $\beta 1$. Afin d'aller plus loin dans la compréhension du rôle de l'intégrine $\beta 1$ dans la réponse à la BMP-2, nous nous sommes intéressés à l'expression des gènes cibles de la voie BMP/SMAD dans nos deux lignées cellulaires après stimulation à la BMP-2. Pour ce faire, nous avons tout d'abord utilisé un système de gène rapporteur luciférase sous le contrôle d'éléments de réponse à la BMP, les BMP responsive elements (BRE). Cette approche nous a permis de révéler un défaut important de réponse à la BMP-2 au niveau transcriptionnel en absence d'intégrine $\beta 1$ (Figure III.2.D.). En effet, alors que les cellules sauvages présentent une induction significative de l'activité luciférase après traitement à la BMP-2, les cellules dépourvues d'intégrine $\beta 1$ présentent une induction très faible. Cette absence de réponse transcriptionnelle à la BMP-2 en absence d'intégrine $\beta 1$ a finalement été corrélée à un défaut de réponse fonctionnelle de ces ostéoblastes. En effet, nous avons pu montrer par PCR quantitative que les ostéoblastes dépourvus d'intégrine $\beta 1$ n'exprimaient pas les gènes cibles de la voie BMP/SMAD, entre autres Ostérix, la phosphatase alcaline (ALP) et l'ostéocalcine (OCN), en réponse au traitement à la BMP-2 (Figure III.2.E.). Ainsi, ces résultats tendent à montrer que l'intégrine $\beta 1$ est un régulateur de la voie BMP/SMAD, qui agit non pas au niveau des récepteurs à la BMP pour réguler la phosphorylation des SMADs mais plus en aval dans la voie.

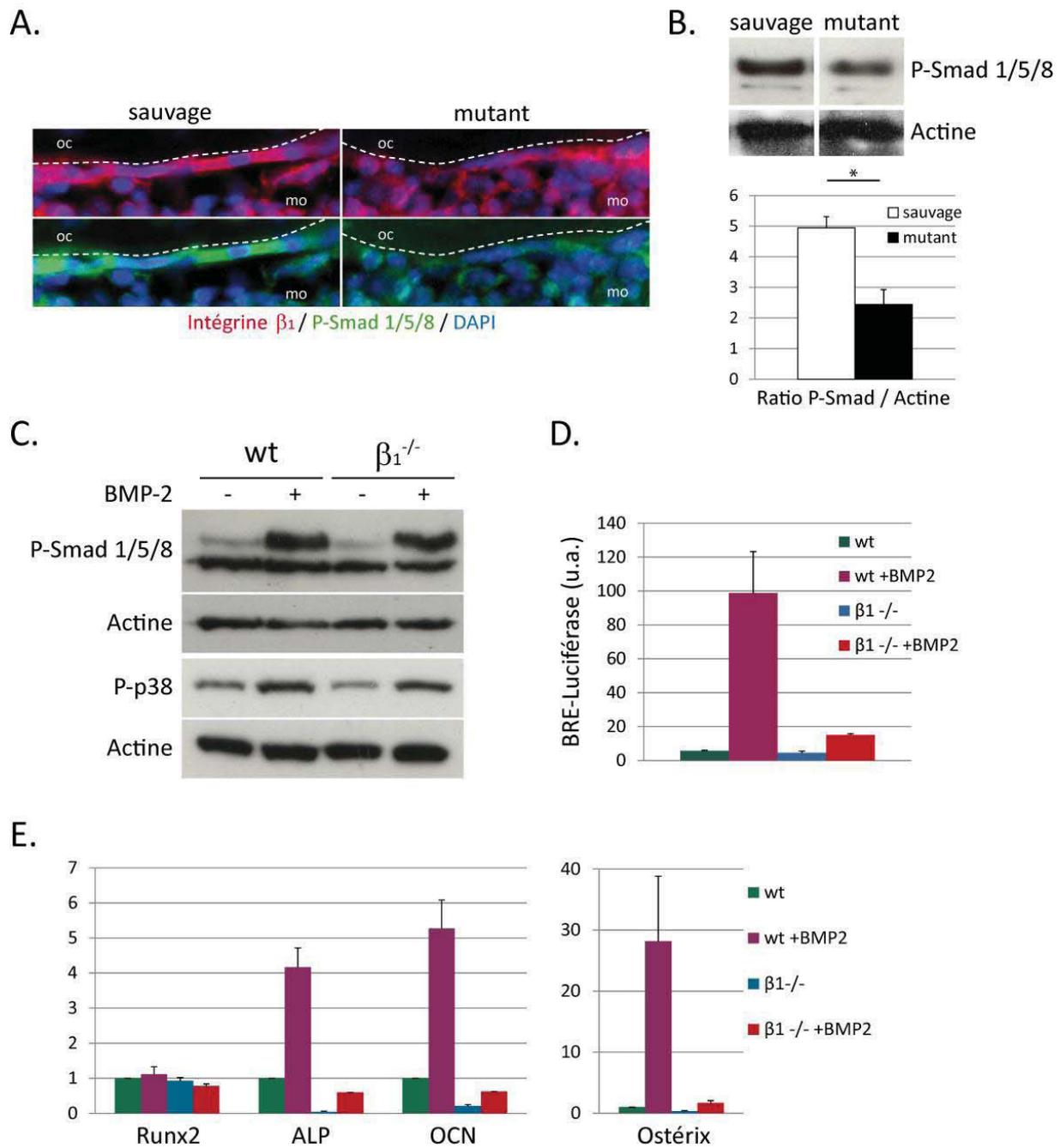


Figure III.2 : L'intégrine $\beta 1$ est indispensable à la réponse à la BMP-2 mais n'agit ni au niveau des récepteurs à la BMP-2, ni au niveau de la phosphorylation des SMADs. **A.** L'activation de la voie BMP/SMADs a été analysée *in vivo* par immunohistologie. Des marquages de la phosphorylation des SMADs 1/5/8 et de l'expression de l'intégrine $\beta 1$ chez des souris sauvages ou mutantes de 4 jours (P4) ont été réalisés sur coupes histologiques. **B.** Les résultats ont été confirmés par western-blot et quantification du niveau de phosphorylation des SMADs 1/5/8 dans des lysats issus d'os longs de souris âgées d'un mois, sauvages ou mutantes. **C.** L'activation des voies de signalisation canoniques dépendantes des BMPs (SMAD et p38) a été étudiée par western-blot suite à un traitement de 48 heures à la BMP-2 (200ng/ml) des cellules sauvages (wt) ou n'exprimant pas l'intégrine $\beta 1$ ($\beta 1^{-/-}$). **D.** L'analyse de l'activité luciférase a été réalisée en utilisant un plasmide contenant le gène de la luciférase sous le contrôle de quatre éléments de réponse à la BMP-2 (BMP Responsive Element, BRE). **E.** Les niveaux d'expression de Runx2, de la phosphatase alcaline (ALP), de l'ostéocalcine (OCN) et d'Ostérix dans les cellules sauvages ou n'exprimant pas l'intégrine $\beta 1$, traitées ou non à la BMP-2 ont été analysés par PCR quantitative.

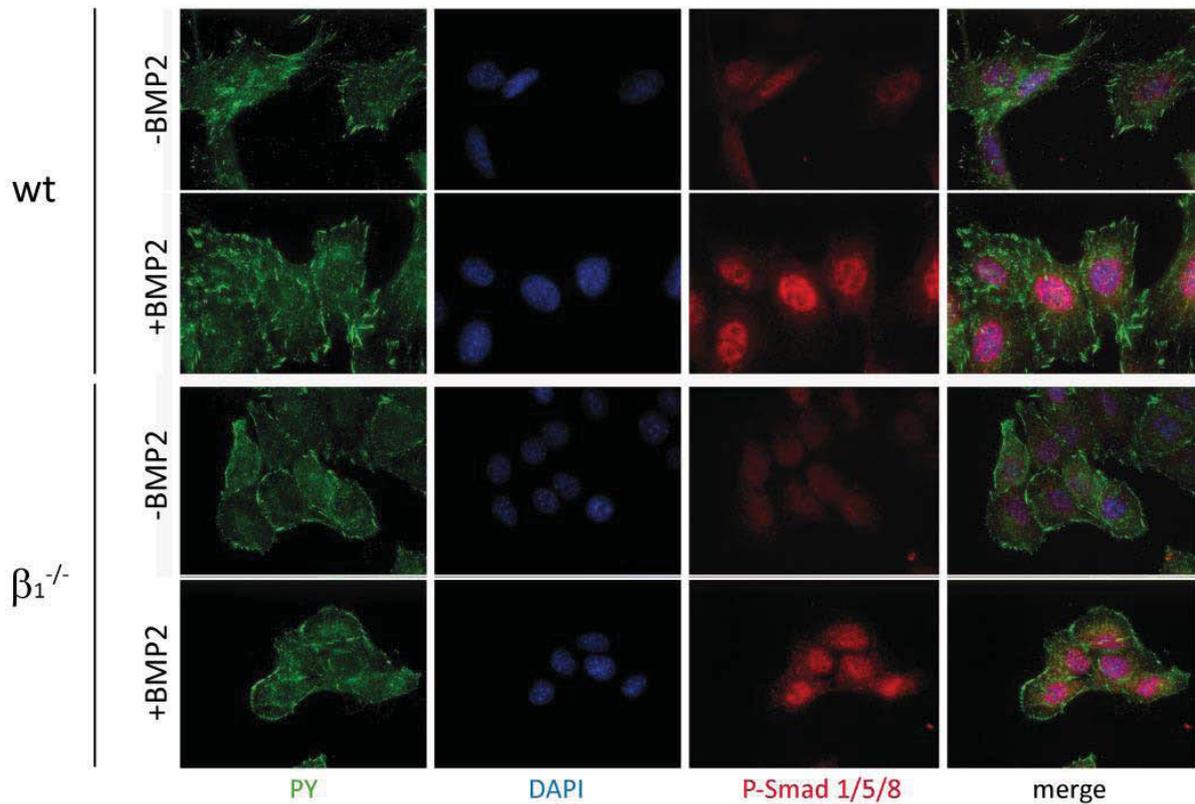
L'intégrine $\beta 1$, commutateur transcriptionnel de la voie BMP / SMADs.

Une fois activées, les SMADs doivent transiter vers le noyau afin d'y réguler l'expression de leurs gènes cibles. Une hypothèse attrayante pour expliquer le rôle des intégrines $\beta 1$ dans la régulation de la transcription dépendante des SMADs serait un rôle des intégrines dans la translocation nucléaire des SMADs. En effet, comme nous l'avons montré dans la partie précédente avec le cofacteur de transcription YAP, la signalisation intégrine peut réguler la localisation subcellulaire de différentes protéines. Ainsi, ERK mais aussi le coactivateur de c-Jun, la protéine α -NAC ont, eux aussi, une localisation nucléaire dépendante de la signalisation intégrine (Aplin et al., 2001; Quelo et al., 2004). Nous avons donc voulu savoir si les SMADs 1 et 5, une fois phosphorylées par les BMPRs, nécessitaient une signalisation dépendante de l'intégrine $\beta 1$ pour être transloquées dans le noyau et avoir accès aux promoteurs de leurs gènes cibles. Afin de répondre à cette question, nous avons traité nos deux lignées cellulaires avec de la BMP-2 et nous avons suivi la localisation des SMADs par immunofluorescence. Le traitement à la BMP-2 induit une translocation nucléaire significative des SMADs 1 et 5 dans les cellules sauvages (Figure III.3.A.). Étonnamment, le même résultat est obtenu avec les cellules dépourvues d'intégrine $\beta 1$ qui présentent une nette localisation nucléaire de ces SMADs en réponse à la BMP-2 (Figure III.3.A.). Ces résultats suggèrent donc que l'influence de la signalisation intégrine sur la voie BMP-2/SMADs se situe encore plus en aval, probablement au niveau du recrutement d'autres facteurs nécessaires à la transcription des gènes cibles de la voie BMP.

La signalisation BMP active la protéine kinase D1 (PKD1) dont un des substrats est la déacétylase HDAC-7. HDAC-7 est connu comme étant un répresseur de l'activité transcriptionnelle de Runx2 dans le noyau. Tout comme YAP, sa localisation subcellulaire est dépendante de sa phosphorylation. Ainsi, une fois phosphorylé par PKD1 en réponse à la BMP-2, HDAC-7 est séquestré dans le cytoplasme et la répression de l'activité transcriptionnelle de Runx2 est levée (Jensen et al., 2009; Jensen et al., 2008). Nous avons donc voulu savoir si la signalisation intégrine avait un impact sur cette branche de la signalisation BMP-2 régulant l'activité de Runx2. Pour cela, nous avons analysé l'activité de PKD1 dans les cellules sauvages et dépourvues d'intégrine $\beta 1$. Nous avons pu constater que la phosphorylation et donc l'activité de PKD1 était fortement réduite en absence d'intégrine $\beta 1$ (Figure III.3.B.). Ainsi, il semblerait que la

signalisation intégrine dialogue avec la signalisation dépendante des BMPs, non pas au niveau des SMADs mais plutôt au niveau d'une voie parallèle moins connue impliquant la kinase PKD1 et le répresseur de Runx2, la déacétylase HDAC-7.

A.



B.

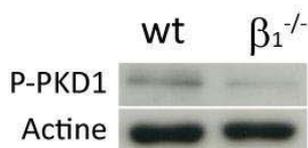


Figure III.3 : L'intégrine β_1 est nécessaire à l'expression des gènes cibles de la BMP-2 non pas en régulant la translocation nucléaire des SMADs mais probablement en permettant leur activité transcriptionnelle. **A.** La translocation nucléaire des SMADs 1/5/8 en réponse à un traitement à la BMP-2 a été analysée par immunofluorescence. Les cellules sauvages (wt) ou n'exprimant pas l'intégrine β_1 ($\beta_1^{-/-}$) ont été traitées une heure à la BMP-2 puis fixées et immunomarquées pour la phosphotyrosine (PY) et la phosphorylation des SMADs (P-Smad1/5/8). **B.** L'activité de la kinase PKD1 a été suivie par western-blot en utilisant un anticorps reconnaissant la forme phosphorylée de PKD1 chez des cellules sauvages (wt) ou n'exprimant pas l'intégrine β_1 ($\beta_1^{-/-}$).

III.3. Discussion

Notre étude a mis en évidence l'importance de la signalisation dépendante de l'intégrine $\beta 1$ dans le processus de différenciation ostéoblastique. L'intégrine $\beta 1$ régule l'expression des gènes cibles de la BMP-2 non pas au niveau des BMPRs comme nous pouvions nous y attendre au vu de la littérature mais bien plus en aval de ces derniers, au niveau transcriptionnel, probablement par l'activation d'une voie dépendante de PKD1 et HDAC-7 (Figure III.4). Cette étude constitue la première preuve de l'implication des intégrines dans la régulation de la voie BMP en aval de l'activation et de la translocation nucléaire des SMADs. Ces données soulignent la complexité de régulation du processus de différenciation par les facteurs solubles d'une part et le microenvironnement matriciel d'autre part. De plus, ces résultats mettent en évidence la nécessité pour une cellule en cours de différenciation de se trouver « au bon endroit » afin de pouvoir se différencier pleinement et devenir fonctionnelle.

III.3.1. L'intégrine $\beta 1$, commutateur de la signalisation BMP-2

L'implication des intégrines dans la signalisation dépendante des facteurs de croissance et plus particulièrement de la BMP-2 est reconnue depuis maintenant un certain nombre d'années. De manière surprenante, dans notre étude, les résultats obtenus *in vivo* et *in vitro* semblent à première vue discordants. *In vivo*, la signalisation BMP-2 est affectée au niveau de la phosphorylation même des SMADs. On observe en effet une diminution importante de cette phosphorylation chez les souris mutantes. *In vitro*, au contraire, la phosphorylation des SMADs n'est pas affectée bien que l'expression des gènes cibles de la BMP ne soit pas effective. Cette apparente contradiction peut s'expliquer de différentes manières. Une première explication pourrait être un effet non « cellule autonome » *in vivo*. L'expression de la BMP-2 étant régulée par la voie BMP/SMAD elle-même via une boucle de rétrocontrôle positif, un défaut de réponse à la BMP-2 devrait conduire à un déficit en BMP-2 dans le microenvironnement osseux *in vivo*. Une diminution de la quantité de BMP-2 *in vivo* du fait du défaut de réponse à la BMP-2 elle-même pourrait donc expliquer la diminution de phosphorylation des SMADs. Ce défaut n'est pas observé *in vitro* puisque l'on traite les cellules avec de la BMP-2 exogène en excès. Dans ce cas, les cellules ne sont pas dépendantes de leur propre production de BMP-2. La seconde hypothèse permettant d'expliquer la divergence des résultats

obtenus *in vivo* et *in vitro* est basée sur l'existence possible d'un phénomène de compensation entre les différentes intégrines *in vitro*. En effet, le répertoire d'expression des intégrines chez les ostéoblastes se partage entre les intégrines à chaînes $\beta 1$ formant entre autres des récepteurs au collagène de type I et à la fibronectine en s'appariant aux sous-unités $\alpha 1-5$, et les intégrines à chaîne αv formant des récepteurs à la fibronectine ou à la BSP en s'appariant aux sous-unités $\beta 3$ et $\beta 5$. On peut donc imaginer qu'*in vitro* les ostéoblastes puissent engager d'autres intégrines que $\beta 1$, compensant ainsi leur perte. Dans ce cas, nos résultats suggèreraient qu'une signalisation intégrine, $\beta 1$ ou autre, est nécessaire à l'activation des SMADs en aval ou au niveau des BMPRs. Cette étape ne serait pas permise *in vivo*, probablement du fait même de la nature de la matrice qui ne permettrait pas d'engager d'autres intégrines que les intégrines $\beta 1$. Afin de vérifier la pertinence de cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier le rôle de différentes matrices et donc de différentes intégrines sur la signalisation BMP-2 dans les ostéoblastes.

III.3.2. Quel point d'entrée pour la signalisation intégrine dans la voie BMP/SMADs ?

Les données obtenues *in vitro* indiquent que l'intégrine $\beta 1$ est nécessaire à la régulation transcriptionnelle des gènes cibles de la voie BMP en aval de la phosphorylation et de la translocation nucléaire des SMADs 1 et 5. Les deux signalisations, intégrines et BMP, se rejoindraient donc au niveau nucléaire, probablement lors de la formation des complexes régulant la transcription. Il a été montré depuis quelques années que le cofacteur de transcription YAP, que nous savons maintenant être régulé par l'intégrine $\beta 1$, coopère avec SMAD1 pour activer la transcription des gènes *Id*, répresseurs de la différenciation neurale en réponse aux BMPs dans des cellules souches embryonnaires (Alarcon et al., 2009). Au vu de l'effet de la perte de l'intégrine $\beta 1$ sur l'activation de YAP, il apparaît attrayant d'imputer l'absence de transcription des gènes dépendant de SMAD1 et 5 à l'absence de YAP nucléaire dans les cellules délétées pour l'intégrine $\beta 1$. Afin de répondre à cette question, nous avons analysé la réponse à la BMP-2 des cellules exprimant le mutant constitutivement actif de YAP (YAP-5SA). Les résultats obtenus indiquent que l'activation constitutive de YAP ne permet pas de restaurer la réponse à la BMP-2 en absence d'intégrine $\beta 1$ (données non montrées). Cette contradiction

apparente avec les données de la littérature pourrait s'expliquer par une action de YAP dépendant du contexte cellulaire et spécifique de certains gènes contrôlés par des SMADs. De plus on peut noter que YAP est un co-répresseur de la transcription dépendante de Runx2 (Zaidi et al., 2004). Cette dernière étude ainsi que nos données, en remplaçant YAP dans un rôle de maintien d'une population de cellules proliférantes non différenciées plutôt que dans un rôle de facteur de différenciation, semble plus en accord avec les données présentant YAP comme un oncogène important.

La BMP-2, en plus d'activer la voie canonique des SMADs, contrôle l'ostéogenèse via l'activation d'une voie dépendante d'HDAC-7 et contrôlant l'activité transcriptionnelle de Runx2. En effet, la BMP-2 en activant PKD1 permet la phosphorylation d'HDAC-7 et sa rétention cytoplasmique. HDAC-7 étant un répresseur transcriptionnel de Runx2, sa rétention cytoplasmique en réponse à la BMP-2 empêche son action inhibitrice et favorise ainsi la transcription des gènes cibles de Runx2 (Jensen et al., 2009; Jensen et al., 2008). Notre hypothèse est que l'intégrine $\beta 1$ serait nécessaire à l'activation de PKD1 en réponse à la BMP-2 (Figure III.4). Les premiers résultats obtenus semblent aller dans ce sens avec un défaut de phosphorylation de PKD1 en absence d'intégrine $\beta 1$. Toutefois, certaines questions restent encore à élucider. En effet, il a été montré en 2004 que l'activation de PKD1 en réponse à la BMP-2 était nécessaire à l'activation des voies JNK et p38 (Lemonnier et al., 2004). Or, malgré le défaut d'activation de PKD1 dans les cellules dépourvues d'intégrine $\beta 1$, nous avons observé que l'activation de p38 en réponse à la BMP-2 restait efficace. Une analyse plus poussée sera donc nécessaire afin de comprendre cette apparente contradiction. L'analyse de souris délétées spécifiquement pour le gène *PKD1* dans les ostéoblastes matures et les ostéocytes (*Dmp1-Cre*) révèle un phénotype ostéopénique caractérisé par un défaut de réponse à la stimulation mécanique et au stress généré par les mouvements de fluides (Xiao et al., 2011). PKD1 semble donc être un élément important dans le ressenti des propriétés mécaniques de l'environnement cellulaire. Le lien entre PKD1 et les intégrines est encore peu connu. Toutefois il apparaît aujourd'hui qu'un dialogue existe entre ces deux entités comme en atteste une étude publiée en 2006 et soulignant le rôle de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ dans la résistance à l'apoptose induite par la perte de PKD1 (Battini et al., 2006).

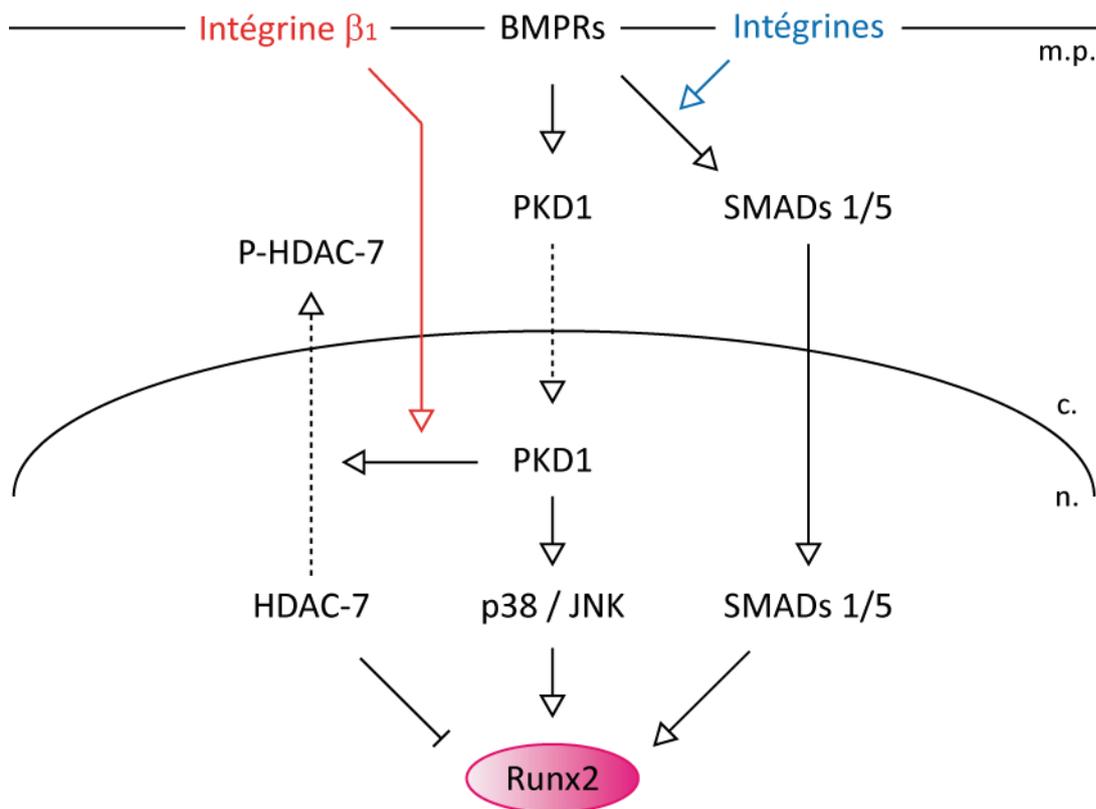


Figure III.4 : Modèle de signalisation pro-ostéogénique dépendante de la BMP-2 et des intégrines. La BMP-2 en se fixant sur ses récepteurs (BMPRs) active des voies de signalisation dépendantes ou non des SMADs 1 et 5. Les intégrines, en général, semblent être des éléments importants de la signalisation BMP dépendante des SMADs. L'intégrine $\beta 1$ spécifiquement jouerait un rôle dans la signalisation BMP dépendante de la kinase PKD1 et régulant la translocation cytoplasmique d'HDAC-7, un répresseur du facteur ostéogénique Runx2 (m.p.: membrane plasmique; c.: cytoplasme; n.: noyau)

De manière surprenante, la perte de PKD1 *in vivo* est à l'origine non pas d'un défaut de prolifération ostéoblastique mais d'une augmentation de cette prolifération (Xiao et al., 2010). Ces résultats placent PKD1 comme un facteur anti-prolifératif. Dans notre système, la perte de l'intégrine $\beta 1$ induit une diminution de l'activité de PKD1. On devrait donc s'attendre à observer une augmentation de la prolifération ostéoblastique, ce qui n'est pas le cas, au contraire. Il semble donc que la voie de prolifération dépendante de YAP soit dominante dans les ostéoblastes sur la voie dépendante de la perte d'activité de PKD1. Il serait donc intéressant à ce propos d'étudier le dialogue entre ces deux voies et d'analyser la possibilité d'un effet de la perte de PKD1 sur l'activité de YAP.

DISCUSSION GENERALE

Dans cette étude, nous avons pu mettre en lumière le rôle de l'intégrine $\beta 1$ et de l'un de ses partenaires, ICAP-1 α , dans le développement et l'homéostasie du tissu osseux. Les résultats que nous avons obtenus soulignent la nécessité pour les précurseurs ostéoblastiques de recevoir et intégrer un panel d'informations de différentes natures (facteurs solubles, nature de l'environnement matriciel, contraintes mécanique...) en provenance du milieu extracellulaire afin de se différencier « au bon moment » et « au bon endroit ». Nos résultats placent l'intégrine $\beta 1$ comme un élément central régulant à la fois la prolifération des précurseurs ostéoblastiques, leur différenciation en ostéoblastes matures et leur fonction d'assemblage de la matrice extracellulaire.

Une notion fondamentale qui ressort de ce travail et de sa mise en parallèle avec les études précédemment publiées est la notion de dépendance temporelle. Cette notion est particulièrement évidente lorsque l'on compare les différents modèles murins de délétion du gène de l'intégrine $\beta 1$ dans la lignée ostéoblastique. En effet, l'utilisation de différents promoteurs pour réguler l'expression de la recombinaise Cre et donc la délétion de l'intégrine $\beta 1$ permet de cibler un stade de différenciation en particulier. Alors que la génération de souris Prx1-Cre permet de cibler les précurseurs squelettiques, la génération de souris Runx2-Cre, Osterix-Cre, Col1(2.3Kb)-Cre, Ostéocalcine-Cre et DMP-Cre permet de cibler les ostéoblastes au cours de leur différenciation d'une manière dépendante de l'avancement de cette dernière. Bien qu'à l'heure actuelle très peu d'études comparatives aient été publiées concernant la fonction de l'intégrine $\beta 1$ à différentes stades de différenciation, notre travail souligne d'importantes différences phénotypiques selon le stade auquel est réalisée la délétion. Par exemple, la délétion de l'intégrine $\beta 1$ avec le promoteur Col(2.3Kb) conduit à un phénotype osseux léger alors que sa délétion avec le promoteur Ostérix montre un rôle important de l'intégrine $\beta 1$ dans la prolifération et la fonction des cellules osseuses. Au delà du rôle de l'intégrine $\beta 1$, cette hypothèse semble se confirmer pour d'autres gènes tels que *Fak* par exemple (Bouvard et Brunner, données personnelles). Cette notion de dépendance temporelle a aussi été récemment illustrée par une utilisation très élégante de différentes souris transgéniques exprimant le rapporteur LacZ à différents stades de différenciation ostéoblastique. De ce travail est ressorti un concept intéressant selon lequel les cellules osseuses sont engagées dans le stroma osseux, le long des vaisseaux sanguins ou dans le périoste et elles acquièrent leur capacité à déposer et minéraliser la

matrice lorsqu'elles atteignent la surface osseuse (Maes et al., 2010b). Il reste encore à élucider les signaux permettant le maintien d'un état indifférencié de la cellule avant qu'elle n'ait atteint une zone à minéraliser. Toutefois, une hypothèse que nous testons en ce moment serait que la composition et la rigidité de la matrice pourraient être impliquées. En effet, comme nous l'avons vu la composition et les propriétés physiques de la matrice osseuse sont importantes pour la prolifération et la différenciation ostéoblastique et les intégrines, en tant que lien direct entre la MEC et le cytoplasme cellulaire, sont bien positionnées pour intégrer ce signal. Notre étude a pu montrer que l'intégrine $\beta 1$ est un relai important pour la réponse à la BMP-2, ainsi qu'un élément déterminant de la prolifération des précurseurs osseux. Ainsi, il est possible que l'intégrine $\beta 1$ restreigne la maturation de l'ostéoblaste tant que ce dernier n'a pas atteint sa localisation finale. De même, la nature de la matrice déposée par l'ostéoblaste pourrait, via l'intégrine $\beta 1$, envoyer un signal d'arrêt afin de contrôler le dépôt osseux. En allant plus loin, on peut imaginer que la rigidité et la composition de la matrice vont contribuer à moduler les signalisations engendrées par des facteurs tels que les BMPs, WNT, ou encore les FGFs afin d'assurer le contrôle spatio-temporel de la prolifération et de la différenciation ostéoblastique.

De nombreuses questions restent encore en suspens concernant la fonction des molécules d'adhésion dans la physiologie osseuse. Parmi celles-ci et concernant la fonction des différents hétérodimères d'intégrines, ont-ils des fonctions redondantes ou des fonctions individuelles spécifiques ? La génération et la comparaison de souris délétées pour une ou plusieurs sous-unités d'intégrines va permettre d'apporter des réponses intéressantes à ces questions. Entre autres, nous commençons à étudier au laboratoire l'effet de la délétion simultanée des sous-unités $\beta 1$ et αv . La comparaison de ces souris avec celles délétées uniquement pour la sous-unité $\beta 1$ va nous apporter de nombreuses informations concernant la possible redondance et le rôle de ces deux intégrines dans la prolifération, la différenciation et la fonction ostéoblastique. Une autre question importante sera de comprendre le rôle des protéines associées aux intégrines et prenant part à leur signalisation dans ces processus. En effet, des protéines telles que FAK et ILK sont des relais importants pour la signalisation dépendante des intégrines et à l'heure actuelle seules des données concernant FAK ont été publiées avec un rôle apparemment très superficiel de cette protéine dans la formation osseuse. Toutefois, comme pour l'intégrine $\beta 1$ ces données ont été obtenues par l'utilisation du

promoteur Coll(2.3Kb) pour déléter le gène *Fak* (Kim et al., 2007; Leucht et al., 2007) , alors que la délétion de FAK dans la population pré-ostéoblastique, par utilisation du promoteur Ostérix, conduit à un phénotype plus marqué avec des fractures à la naissance (travail en cours).

La formation osseuse est un processus hautement intégré, et la connexion entre les cellules et la matrice extracellulaire est essentielle. Toutefois, ce processus doit être relié à d'autres fonctions cellulaires telles que l'adhésion intercellulaire ou encore l'activité transcriptionnelle. Dans ces deux domaines, d'importantes questions sont à élucider comme : Quel dialogue existe-t-il entre les intégrines et les jonctions cellule-cellule et quel rôle jouent les intégrines dans la signalisation dépendante de ces jonctions ? Ou encore comment les interactions d'une cellule avec la MEC via les intégrines contrôlent le programme transcriptionnel de cette dernière ?

MATERIEL ET METHODES

Les matériels et méthodes utilisés dans la première partie des résultats et publiés dans The Journal of Cell Biology ne seront pas décrits dans cette partie, puisque déjà détaillés dans l'article en question (Résultats Partie I.4).

I. MATÉRIELS

I.1. Protéines, Réactifs et Anticorps

I.1.1. Protéines

Le BMP-2 utilisé pour traiter les cellules provient de chez Shenandoah Biotechnology Inc. et a été utilisé à une concentration de 200 µg/mL.

I.1.2. Réactifs

Le BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine), le DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole), le mowiol, la collagénase de type I, la calcéine, l'alizarine, le SQ22536 et la forskoline proviennent de chez Sigma-Aldrich. La trypsine provient de chez Gibco BRL.

I.1.3. Anticorps

Les anticorps utilisés, leur origine et les dilutions utilisées sont indiqués dans le tableau ci-après.

Anticorps	Clone	Origine	Dilution western-blot	Dilution immuno-fluorescence	FACS
Actine	AC-40	Sigma-aldrich	1/1000	-	-
Collagène type 1	-	Abcam	-	1/500	-
BrdU	BU33	Sigma-aldrich	-	1/250	-
YAP/TAZ	D24E4	Cell signaling	1/500	1/500	-
P-YAP (Ser 127)	-	Cell signaling	1/500	-	-
P-tyrosine	4G10	Millipore	-	1/500	-
Intégrine β1 (murine)	MB1.2	Millipore	-	1/200	1/200
Intégrine β1 (humaine)	4B7R	Neomarkers	-	1/200	1/200
Intégrine β1 (murine)	9EG7	BD Biosciences	-	1/200	1/200
P-Smad 1/5/8	-	Cell signaling	1/500	1/500	-
P-ERK1/2(Thr202/Tyr204)	-	Cell signaling	1/500	-	-
P-PKD1 (Ser 916)	-	Cell signaling	1/500	-	-

I.2. Bactéries

Des bactéries *Escherichia coli* DH5 α ont été rendues compétentes pour être transformées par choc thermique (45 sec à 42°C) et ont été utilisées pour amplifier les ADN plasmidiques.

I.3. ADN plasmidique

Les vecteurs d'expression utilisés sont : pBABE-MEK1^{Q56P} (don de M. Barbacid), pCMV-flag YAP2 5SA (don de K.L. Guan), $\beta 1^{785A}$ a été généré à partir du vecteur pCL-FMG $\beta 1^{wt}$ par mutagenèse dirigée (QuickChange), pElb-BRE4xLuc (don de J. Massagué).

II. METHODES

II.1. Techniques de biologie animale

II.1.1. Production et génotypage des souris transgéniques

Afin d'obtenir des souris contrôles (Osx-Cre -), hétérozygotes (Osx-Cre + ; $\beta 1^{+/f}$) et mutantes (Osx-Cre + ; $\beta 1^{f/f}$), des souris floxées pour le gène de l'intégrine $\beta 1$ (don de R. Fässler)(fond génétique Sv129) ont été croisées avec des souris exprimant la Cre-recombinase sous le contrôle du promoteur du facteur de transcription Ostérix (don de A. McMahon) (fond génétique C57BL6). L'ADN a été isolé à partir des queues ou des sacs vitellins pour les embryons. Les biopsies ont été lysées à 56°C dans un tampon de lyse (hydrochlorure de Tris-(Hydroxyméthyl)-aminométhane (Tris-HCl) 1M pH8, acide éthylènediamine-tétracétique (EDTA) 0,5M pH8, dodécyl-sulfate de sodium (SDS) 20% v/v, chlorure de sodium (NaCl) 5M, protéinase K 0,5mg/mL) et l'ADN a été précipité à l'isopropanol (50% v/v final). Une PCR utilisant des amorces spécifiques de la Cre-recombinase a été réalisée (Cre5 : 5'-CCTGGAAAATGCTTCTGTCCGTTTGCC-3' et Cre3 : 5'-GAGTTGATAGCTGGCTGGTGGCAGATG-3'). De même, le génotypage de l'intégrine $\beta 1$ a été réalisé en utilisant un jeu d'amorces donnant respectivement des fragments de 320pb et 400pb pour les allèles sauvages et floxés (T56 : 5'-GGGTTGCCCTTCCCTCTAG-3' et L1 : 5'-GTGAAGTAGGTGAAAGGTAAC-3').

II.1.2. Marquage des squelettes à l'Alizarine et au Bleu d'Alcian

Après euthanasie, les souris sont dépecées et débarrassées de leurs organes internes puis fixées dans une solution d'éthanol 70% pendant 2 jours. Les souris sont incubés 2 jours dans une solution d'acétone afin d'éliminer les graisses et permettre une meilleure coloration des squelettes. Elles sont ensuite colorées pendant 2 jours dans une solution de coloration (alizarine 0,05g/l, bleu d'alcian 0,15g/l, acide acétique 5% v/v) puis les tissus restants sont digérés dans de l'hydroxyde de potassium (KOH) 1% m/v.

II.1.3. Histomorphométrie

Les analyses histomorphométriques ont été réalisées en collaboration avec l'équipe du Dr. I. Nakchbandi (Heidelberg, Allemagne). Des souris d'un mois ont été injectées en intra-péritonéale avec une solution d'alizarine (0,1mg/3g de souris) 10 et 3 jours avant euthanasie. Le fémur et le tibia ont été prélevés et fixés en éthanol 70% pour être ensuite inclus et analysés comme décrit dans la littérature (Bentmann et al., 2010).

II.1.4. Mesure de la densité minérale osseuse

La mesure de densité minérale osseuse (BMD) réalisée elle aussi en collaboration avec l'équipe du Dr. I. Nakchbandi, a été réalisée par tomographie quantitative (peripheral quantitative computer tomography (pQCT)) comme décrit dans la littérature (Bentmann et al., 2010). La densité trabéculaire a été examinée sur un site localisé à 7,5% de la longueur osseuse à partir de la plaque de croissance.

II.1.5. Histologie et Immunohistochimie

Pour les marquages BrdU, les souris ont été injectées 2 heures avant leur sacrifice avec une solution de BrdU (0,15mg/g). Les os des souris ont été fixés en paraformaldéhyde (PFA) 4% contenant 3% de sucrose pendant 24 heures. Les os ont ensuite été décalcifiés dans une solution d'EDTA 10% pH7.4 durant un temps variable (1 semaine à 3 semaines) selon la taille des pièces anatomiques. Les pièces ont ensuite été incluses en paraffine et coupées au microtome. Avant les immunomarquages, les lames sont déparaffinées par deux bains consécutifs de 3 minutes en toluène et réhydratées par des bains de concentration décroissante en éthanol : 100% deux fois 1 minute ; 95% 1 minute ; 90% 1 minute ; 75% 1 minute ; 50% 1 minute puis 3 bains de 5 minute en tampon phosphate (PBS).

La technique utilisée pour les immunomarquages est décrite au paragraphe II.2.4. Les anticorps utilisés sont listés plus haut. Le marquage de la phosphatase alcaline tartrate résistante (TRAP) a été réalisé selon le protocole du « Leukocyte acid phosphatase (TRAP) kit » provenant de chez Sigma.

Pour les marquages BrdU, les lames après déparaffinage sont incubées 20 minutes à température ambiante dans une solution d'HCl 4N. Elles sont ensuite incubées 10 minutes à 37°C dans une solution de trypsine 0,1% puis rincées 3 fois 5 minutes dans une solution de lavage (0,5% albumine de sérum bovin (BSA), 0,1% Tween-20 dans du PBS). Les lames sont ensuite saturées et immunomarquées de manière classique (voir paragraphe II.2.4.)

II.1.6. Lysats protéiques à partir d'os longs

Afin d'obtenir des lysats protéiques à partir des os longs des souris, ces dernières sont euthanasiées et les os longs sont rapidement prélevés et congelés dans de l'azote liquide. Les os sont ensuite broyés par agitation en présence d'une bille métallique (Retsch MM400 ; 3 cycles de 1 minute à 30 mouvements/s) et lysés dans un tampon RIPA (voir paragraphe II.3.1). Les lysats sont ensuite centrifugés 30 minutes à 16 000 rpm et le surnageant est récupéré. Les protéines sont dénaturées 10 minutes à 95°C dans du bleu de dépôt (bleu de bromophénol, 1,16M β -mercaptoéthanol, 10% SDS).

II.2. Techniques de biologie cellulaire

II.2.1. Génération de lignées cellulaires intégrine $\beta 1^{f/f}$ (wt) et intégrine $\beta 1^{-/-}$ ($\beta 1^{-/-}$)

Les ostéoblastes exprimant l'intégrine $\beta 1$ (wt), ne l'exprimant pas ($\beta 1^{-/-}$), ou exprimant un mutant de l'intégrine $\beta 1$ ($\beta 1^{785A}$) sont issus de souris possédant une invalidation conditionnelle de l'intégrine $\beta 1$ (don de R. Fässler). Les ostéoblastes ont été isolés à partir de la calvaire de souris nouveau-nés de génotype intégrine $\beta 1^{f/f}$ en utilisant un mélange de collagénase de type I (0,3mg/mL) et de trypsine (0,25%) comme décrit dans la littérature (Bouvard et al., 2007). Ces cellules ont ensuite été immortalisées par infection avec un surnageant rétroviral permettant l'expression de la protéine « Large-T » du Simian Virus 40 (SV40). Après immortalisation, les cellules ont été clonées par dilution limite et plusieurs clones ont été sélectionnés sur leurs capacités de

différenciation. Ces clones ont ensuite été délétés pour le gène de l'intégrine $\beta 1$ par deux infections consécutives avec un adénovirus exprimant la Cre-recombinase. Ces cellules ont ensuite été clonées par dilution limite et plusieurs clones intégrine $\beta 1^{-/-}$ ont été sélectionnés par immunofluorescence et FACS en utilisant l'anticorps MB1.2.

Les lignées d'ostéoblastes déficients en intégrine $\beta 1$ et exprimant le mutant 785A de l'intégrine $\beta 1$ ont été générées à partir de la lignée d'ostéoblastes déficients en intégrine $\beta 1$. La forme mutée 785A humaine de l'intégrine $\beta 1$ a été ré-exprimée après infection rétrovirale utilisant le vecteur pCL-FMG- $\beta 1^{785}$. Le niveau d'expression de la forme mutée de l'intégrine a été analysé par FACS en utilisant l'anticorps 4B7R.

Les lignées exprimant les mutants activés de MEK (MEK-Q56P) ou YAP2 (YAP-5SA) ont été générées à partir des lignées délétées ou non pour l'intégrine $\beta 1$ et infectées avec des rétrovirus générés par utilisation des vecteurs pBABE-MEK1 Q56P (don de M. Barbacid) et pCMV-flag YAP2 5SA (don de K.L. Guan).

Afin de réaliser les tests de réponse au BMP2, les cellules ont été infectées transitoirement avec un adénovirus généré à partir du vecteur pElb-BRE4xLuc (don de J. Massagué).

II.2.2. Transfection et infection rétrovirale

La transfection est utilisée pour produire les rétrovirus avec les cellules 293T. Le transfectant utilisé est le PolyFect (QIAGEN). 8 μg d'ADN plasmidique sont ajoutés à 300 μL final de DMEM sans sérum et 80 μL de PolyFect. Le mélange est vortexé et incubé 20 minutes à température ambiante puis déposé à raison de 10% du volume final sur des cellules confluentes à 40%. Le surnageant contenant les virus est ensuite récupéré à 24h, 48h et 72h. Les surnageants sont réutilisés directement pour infecter les lignées d'ostéoblastes ou trois cycles de congélation/décongélation sont réalisés pour lyser les cellules et récupérer un maximum de virus.

L'infection rétrovirale des précurseurs ostéoblastiques a été réalisée en diluant au demi les surnageants rétroviraux en présence de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Polybrène en DMEM supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) (10%). Les cellules ont été incubées dans ces conditions 24 heures à 37°C puis le milieu a été changé.

Les infections adénovirales ont été réalisées en diluant au demi les surnageants viraux. Les cellules ont été incubées 2 heures à 37°C puis le milieu a été changé.

II.2.3. Traitement des cellules

Pour les lysats cellulaires et l'analyse par western-blot, les cellules ont préalablement été ensemencées à raison de 1.10^6 cellules/boîte et $3,5.10^6$ cellules/boîte pour les cellules sauvages et n'exprimant pas l'intégrine $\beta 1$ respectivement. Ces concentrations cellulaires permettent en effet d'obtenir après 12 heures un nombre suffisant de cellules en phase exponentielle de croissance et de compenser le défaut de prolifération des cellules $\beta 1^{-/-}$. Pour les immunofluorescence les cellules sont ensemencées à la même concentration dans les plaques 24 puits contenant des lamelles de verre et laissées à étaler 12 heures. Les cellules sont ensuite traitées durant 1 heure avec la forskoline ($10 \mu\text{M}$) ou le SQ22536 ($10 \mu\text{M}$) sans changer le milieu de culture.

II.2.4. Immunofluorescences

Les cellules sont étalées sur des lamelles en verre durant environ 12 heures. Elles sont ensuite traitées ou non puis fixées dans une solution de PBS contenant 4% de PFA et 3% de sucrose, perméabilisées dans 0,2% de Triton X-100 puis saturées dans du sérum de chèvre 10%. Les cellules sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire approprié durant 1 heure à température ambiante (PBS, Tween 0.1%, sérum de chèvre 10% v/v) Après rinçage en PBS Tween 0,1%, les cellules sont incubées en présence de DAPI ($0,1 \mu\text{g}/\text{mL}$) avec l'anticorps secondaire approprié conjugué à un fluorochrome (Alexa-546 ou Alexa-488) dilué dans la même solution que celle utilisée pour l'anticorps primaire. Finalement, après rinçage, les lames sont montées dans une solution de Mowiol et visualisées sur un microscope droit (Axioimager, Carl Zeiss, Inc.).

II.2.5. Tests de prolifération

Deux types de test de prolifération ont été utilisés dans cette étude.

Dans le premier type de test, les cellules ont été ensemencées à une concentration de 5.10^4 cellules/mL dans des plaques 6 puits et le nombre de cellules par champ de microscope optique (grossissement x40) a été compté 24 heures et 48 heures après ensemencement. Les valeurs représentent la moyenne du comptage de 10 champs choisis aléatoirement par condition.

Dans le second type de test, les cellules ont été ensemencées à raison de 5.10^4 cellules/mL dans des plaques 24 puits contenant des lamelles de verre. Après 12 heures

d'adhésion, les cellules ont été traitées au BrdU (10 μ M) durant 1 heure puis fixées et immunomarquées. Les cellules positives pour le marquage BrdU ont ensuite été comptées sous microscope. Les données représentent le pourcentage de cellules positives pour le BrdU.

II.2.6. Tests de différenciation

Les cellules sont ensemencées en plaque 24 puits dans du DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF) à raison de 6.10⁴ cellules/puits pour les cellules sauvages (wt) et 27.10⁴cellules/puits pour les cellules dépourvues d'intégrine β 1 afin de compenser leur défaut de prolifération. Après 48 heures, les cellules des deux lignées étant à confluence, un milieu de différenciation ostéogénique (α -MEM, 10% SVF (Fœtal Clone II, Hyclone), acide ascorbique 0,05 mg/mL, β -glycérophosphate 0,01M) est alors ajouté aux cellules et remplacé tous les deux jours. Le marquage au rouge d'alizarine est effectué après fixation des cellules au PFA 4%. Après deux rinçages à l'eau distillée, les cellules sont incubées 30 minutes dans une solution d'Alizarine (40 mM, pH 4.1) puis lavées 4 fois 5 minutes avec de l'eau distillée.

II.3. Techniques de biochimie

II.3.1. Western-blot

Les cellules sont lysées dans un tampon RIPA (1% Triton X100, 1% sodium déoxycholate, 0,1% SDS, 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH7.2) supplémenté en inhibiteur de protéases (Roche) et inhibiteur de phosphatase (cocktail 1 et 3 de chez Sigma-Aldrich). Après quantification des protéines par dosage à l'acide bicinchoninique (BCA), une quantité égale de protéines est déposée sur gel SDS-PAGE puis les protéines séparées sont transférées sur une membrane de polyvinylidifluorure (PVDF). La membrane est ensuite incubée dans une solution de Tris-buffered saline (TBS) Tween-20 0,1% BSA 5% durant 1 heure pour saturation. L'anticorps primaire approprié est dilué dans la même solution et la membrane y est incubée sur la nuit à 4°C sous agitation. Après 3 lavages de 15 minutes en TBS Tween-20 0,1%, la membrane est incubée 1 heure à température ambiante sous agitation dans l'anticorps secondaire approprié couplé à la peroxydase de raifort (HorseRadish Peroxidase; HRP). L'activité de la peroxydase est alors révélée par chimioluminescence (ECL, GE Healthcare).

II.3.2. Fractionnement cellulaire

Le fractionnement cellulaire a été réalisé selon le protocole du kit de fractionnement subcellulaire pour cellules en culture (Thermoscientific).

II.3.3. PCR quantitative

Les ARN messagers ont été extraits des cultures par l'utilisation du kit d'extraction RNeasy Mini Kit (QIAGEN). Après dosage, une RT-PCR a été réalisée sur 2,5 µg d'ADN en mélangeant 5 µL de VILO Reaction mix (5X), 2,5 µL de SuperScript Enzyme Mix (10x). Ce mélange a été incubé 10 minutes à 25°C puis 1 heure à 42°C et enfin 5 minutes à 85°C. Après cette étape de transcription inverse, les échantillons dilués au vingtième ont été analysés par qPCR (appareil Biorad) en utilisant le GoTaq qPCR Master Mix (Promega) et les amorces suivantes :

	Séquence « sens »	Séquence « anti-sens »
CTGF	AGGAGTGGGTGTGTGACGA	CCAGGCAGTTGGCTCTAATC
Ostéocalcine (OCN)	AAGCAGGAGGGCAATAAGGT	AGCTGCTGTGACATCCATAC
Collagène type I	CCTGGTAAAGATGGGCC	CACCAGGTTACCTTTTCGCACC
Runx2	CCGCACGACAACCGCACCAT	CGCTCCGGCCCACAAATCTC
ALP	GCCCTCTCCAAGACATATA	CCATGATCACGTCGATATCC
Ostérix (Osx)	CCTAGCAGACACCATGAG	TCTGATAGCTCGTCACAAG
β-actin	TCCTCCCTGGAGAAGAGCTAC	TCCTGCTTGCTGATCCACAT
U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT

La β-actine et U6 ont été utilisés comme gènes de ménage.

II.3.4. Dosage de l'AMP cyclique

Le dosage de l'AMP cyclique a été réalisé selon le protocole du kit « cyclic AMP complete ELISA Kit » de chez Abnova (KA0320).

BIBLIOGRAPHIE

- Agis, H., et al., 2010. Collagen barrier membranes decrease osteoclastogenesis in murine bone marrow cultures. *Clin Oral Implants Res.* 21, 656-61.
- Ahmed, N., et al., 2002. Direct integrin alphavbeta6-ERK binding: implications for tumour growth. *Oncogene.* 21, 1370-80.
- Alarcon, C., et al., 2009. Nuclear CDKs drive Smad transcriptional activation and turnover in BMP and TGF-beta pathways. *Cell.* 139, 757-69.
- Alvarez, B., et al., 2008. Integrin Cytoplasmic domain-Associated Protein-1 (ICAP-1) promotes migration of myoblasts and affects focal adhesions. *J Cell Physiol.* 214, 474-82.
- Amizuka, N., et al., 1994. Parathyroid hormone-related peptide-depleted mice show abnormal epiphyseal cartilage development and altered endochondral bone formation. *J Cell Biol.* 126, 1611-23.
- Aplin, A. E., et al., 2001. Integrin-mediated adhesion regulates ERK nuclear translocation and phosphorylation of Elk-1. *J Cell Biol.* 153, 273-82.
- Arias-Salgado, E. G., et al., 2003. Src kinase activation by direct interaction with the integrin beta cytoplasmic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 13298-302.
- Arias-Salgado, E. G., et al., 2005. Specification of the direction of adhesive signaling by the integrin beta cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* 280, 29699-707.
- Arnaout, M. A., et al., 2007. Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol.* 19, 495-507.
- Ashton, G. H., et al., 2004. Recurrent mutations in kindlin-1, a novel keratinocyte focal contact protein, in the autosomal recessive skin fragility and photosensitivity disorder, Kindler syndrome. *J Invest Dermatol.* 122, 78-83.
- Askari, J. A., et al., 2009. Linking integrin conformation to function. *J Cell Sci.* 122, 165-70.
- Bader, B. L., et al., 1998. Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all alpha v integrins. *Cell.* 95, 507-19.
- Ballestrem, C., et al., 2001. Marching at the front and dragging behind: differential alphaVbeta3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior. *J Cell Biol.* 155, 1319-32.
- Bandyopadhyay, A., et al., 2006. Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genet.* 2, e216.
- Barczyk, M., et al., 2009. Integrins. *Cell Tissue Res.* 339, 269-80.
- Basu, S., et al., 2003. Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Mol Cell.* 11, 11-23.
- Battini, L., et al., 2006. Stable knockdown of polycystin-1 confers integrin-alpha2beta1-mediated anoikis resistance. *J Am Soc Nephrol.* 17, 3049-58.
- Bengtsson, T., et al., 2005. Loss of alpha10beta1 integrin expression leads to moderate dysfunction of growth plate chondrocytes. *J Cell Sci.* 118, 929-36.
- Bennett, J. S., et al., 2009. The structure and function of platelet integrins. *J Thromb Haemost.* 7 Suppl 1, 200-5.
- Bentmann, A., et al., 2010. Circulating fibronectin affects bone matrix, whereas osteoblast fibronectin modulates osteoblast function. *J Bone Miner Res.* 25, 706-15.
- Beraud-Dufour, S., et al., 2007. Krit 1 interactions with microtubules and membranes are regulated by Rap1 and integrin cytoplasmic domain associated protein-1. *FEBS J.* 274, 5518-32.
- Bertotti, A., et al., 2006. Beta4 integrin activates a Shp2-Src signaling pathway that sustains HGF-induced anchorage-independent growth. *J Cell Biol.* 175, 993-1003.
- Bianchi, E., et al., 2000. Integrin LFA-1 interacts with the transcriptional co-activator JAB1 to modulate AP-1 activity. *Nature.* 404, 617-21.
- Bikle, D. D., 2008. Integrins, insulin like growth factors, and the skeletal response to load. *Osteoporos Int.* 19, 1237-46.

- Bikle, D. D., et al., 1994. Altered skeletal pattern of gene expression in response to spaceflight and hindlimb elevation. *Am J Physiol.* 267, E822-7.
- Bilato, C., et al., 1997. The inhibition of vascular smooth muscle cell migration by peptide and antibody antagonists of the alphavbeta3 integrin complex is reversed by activated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Clin Invest.* 100, 693-704.
- Block, M. R., et al., 2008. Podosome-type adhesions and focal adhesions, so alike yet so different. *Eur J Cell Biol.* 87, 491-506.
- Blystone, S. D., et al., 1996. Inducible tyrosine phosphorylation of the beta3 integrin requires the alphaV integrin cytoplasmic tail. *J Biol Chem.* 271, 31458-62.
- Blystone, S. D., et al., 1999. A molecular mechanism of integrin crosstalk: alphavbeta3 suppression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulates alpha5beta1 function. *J Cell Biol.* 145, 889-97.
- Boskey, A. L., et al., 1993. Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel. *Bone Miner.* 22, 147-59.
- Boulter, C., et al., 2001. Cardiovascular, skeletal, and renal defects in mice with a targeted disruption of the Pkd1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 12174-9.
- Bouvard, D., et al., 2007. Defective osteoblast function in ICAP-1-deficient mice. *Development.* 134, 2615-25.
- Bouvard, D., Block, M. R., 1998. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II controls integrin alpha5beta1-mediated cell adhesion through the integrin cytoplasmic domain associated protein-1alpha. *Biochem Biophys Res Commun.* 252, 46-50.
- Bouvard, D., et al., 2001. Functional consequences of integrin gene mutations in mice. *Circ Res.* 89, 211-23.
- Bouvard, D., et al., 2006. Unraveling ICAP-1 function: toward a new direction? *Eur J Cell Biol.* 85, 275-82.
- Bouvard, D., et al., 2003. Disruption of focal adhesions by integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 alpha. *J Biol Chem.* 278, 6567-74.
- Boyden, L. M., et al., 2002. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med.* 346, 1513-21.
- Brancaccio, M., et al., 1999. Melusin is a new muscle-specific interactor for beta(1) integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* 274, 29282-8.
- Brown, E., et al., 1990. Integrin-associated protein: a 50-kD plasma membrane antigen physically and functionally associated with integrins. *J Cell Biol.* 111, 2785-94.
- Brunner, M., et al., 2011. Osteoblast mineralization requires beta1 integrin/ICAP-1-dependent fibronectin deposition. *J Cell Biol.* 194, 307-22.
- Brutsch, R., et al., 2010. Integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 attenuates sprouting angiogenesis. *Circ Res.* 107, 592-601.
- Calderwood, D. A., et al., 2003. Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 2272-7.
- Calderwood, D. A., et al., 2002. The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins. *J Biol Chem.* 277, 21749-58.
- Calderwood, D. A., et al., 1999. The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. *J Biol Chem.* 274, 28071-4.
- Caswell, P. T., et al., 2009. Integrins: masters and slaves of endocytic transport. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10, 843-53.
- Chang, D. D., et al., 2002. Molecular basis for interaction between Icap1 alpha PTB domain and beta 1 integrin. *J Biol Chem.* 277, 8140-5.
- Chang, D. D., et al., 1997. ICAP-1, a novel beta1 integrin cytoplasmic domain-associated protein, binds to a conserved and functionally important NPXY sequence motif of beta1 integrin. *J Cell Biol.* 138, 1149-57.

- Chang, S. F., et al., 2008. Tumor cell cycle arrest induced by shear stress: Roles of integrins and Smad. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 3927-32.
- Chen, J., et al., 2002. The alpha(2) integrin subunit-deficient mouse: a multifaceted phenotype including defects of branching morphogenesis and hemostasis. *Am J Pathol.* 161, 337-44.
- Chen, Y. P., et al., 1992. Ser-752-->Pro mutation in the cytoplasmic domain of integrin beta 3 subunit and defective activation of platelet integrin alpha IIb beta 3 (glycoprotein IIb-IIIa) in a variant of Glanzmann thrombasthenia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 10169-73.
- Chiang, M. K., et al., 2005. Inactivation of tensin3 in mice results in growth retardation and postnatal lethality. *Dev Biol.* 279, 368-77.
- Chiarugi, P., Giannoni, E., 2008. Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochem Pharmacol.* 76, 1352-64.
- Choi, C. K., et al., 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.
- Clark, K., et al., 2005. A specific alpha5beta1-integrin conformation promotes directional integrin translocation and fibronectin matrix formation. *J Cell Sci.* 118, 291-300.
- Coxon, A., et al., 1996. A novel role for the beta 2 integrin CD11b/CD18 in neutrophil apoptosis: a homeostatic mechanism in inflammation. *Immunity.* 5, 653-66.
- Cukierman, E., et al., 2002. Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr Opin Cell Biol.* 14, 633-9.
- Czuchra, A., et al., 2006. Genetic analysis of beta1 integrin "activation motifs" in mice. *J Cell Biol.* 174, 889-99.
- Damsky, C. H., 1999. Extracellular matrix-integrin interactions in osteoblast function and tissue remodeling. *Bone.* 25, 95-6.
- Degani, S., et al., 2002. The integrin cytoplasmic domain-associated protein ICAP-1 binds and regulates Rho family GTPases during cell spreading. *J Cell Biol.* 156, 377-87.
- del Pozo, M. A., et al., 2005. Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization. *Nat Cell Biol.* 7, 901-8.
- DeLise, A. M., et al., 2000. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage.* 8, 309-34.
- Desgrosellier, J. S., Cheresch, D. A., 2010. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer.* 10, 9-22.
- Devlin, R. D., et al., 2003. Skeletal overexpression of noggin results in osteopenia and reduced bone formation. *Endocrinology.* 144, 1972-8.
- DiPersio, C. M., et al., 1997. alpha3beta1 Integrin is required for normal development of the epidermal basement membrane. *J Cell Biol.* 137, 729-42.
- Dong, J., et al., 2007. Elucidation of a universal size-control mechanism in Drosophila and mammals. *Cell.* 130, 1120-33.
- Dos Santos, P. B., et al., 2012. Beta 1 integrin predicts survival in breast cancer: a clinicopathological and immunohistochemical study. *Diagn Pathol.* 7, 104.
- Dowling, J., et al., 1996. Beta4 integrin is required for hemidesmosome formation, cell adhesion and cell survival. *J Cell Biol.* 134, 559-72.
- Du, X. P., et al., 1991. Ligands "activate" integrin alpha IIb beta 3 (platelet GPIIb-IIIa). *Cell.* 65, 409-16.
- Dufour, C., et al., 2007. Skeletal unloading induces osteoblast apoptosis and targets alpha5beta1-PI3K-Bcl-2 signaling in rat bone. *Exp Cell Res.* 313, 394-403.
- Dupont, S., et al., 2011. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature.* 474, 179-83.
- Dzamba, B. J., et al., 1993. Fibronectin binding site in type I collagen regulates fibronectin fibril formation. *J Cell Biol.* 121, 1165-72.
- Easley, C. A. t., et al., 2008. CaMK-II promotes focal adhesion turnover and cell motility by inducing tyrosine dephosphorylation of FAK and paxillin. *Cell Motil Cytoskeleton.* 65, 662-74.
- Ekholm, E., et al., 2002. Diminished callus size and cartilage synthesis in alpha 1 beta 1 integrin-deficient mice during bone fracture healing. *Am J Pathol.* 160, 1779-85.
- Engler, A. J., et al., 2006. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell.* 126, 677-89.

- Engler, A. J., et al., 2007. Extracellular matrix elasticity directs stem cell differentiation. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 7, 335.
- Engvall, E., et al., 1978. Affinity of fibronectin to collagens of different genetic types and to fibrinogen. *J Exp Med.* 147, 1584-95.
- Eriksen, E. F., et al., 2007. Remodeling and vascular spaces in bone. *J Bone Miner Res.* 22, 1-6.
- Eswarakumar, V. P., et al., 2005. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 139-49.
- Fagerholm, S. C., et al., 2005. Specific integrin alpha and beta chain phosphorylations regulate LFA-1 activation through affinity-dependent and -independent mechanisms. *J Cell Biol.* 171, 705-15.
- Fassler, R., Meyer, M., 1995. Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice. *Genes Dev.* 9, 1896-908.
- Fenczik, C. A., et al., 1997. Complementation of dominant suppression implicates CD98 in integrin activation. *Nature.* 390, 81-5.
- Fenczik, C. A., et al., 2001. Distinct domains of CD98hc regulate integrins and amino acid transport. *J Biol Chem.* 276, 8746-52.
- Fournier, H. N., et al., 2002. Integrin cytoplasmic domain-associated protein 1alpha (ICAP-1alpha) interacts directly with the metastasis suppressor nm23-H2, and both proteins are targeted to newly formed cell adhesion sites upon integrin engagement. *J Biol Chem.* 277, 20895-902.
- Fournier, H. N., et al., 2005. Nuclear translocation of integrin cytoplasmic domain-associated protein 1 stimulates cellular proliferation. *Mol Biol Cell.* 16, 1859-71.
- Freedman, A. S., et al., 1993. Stimulation of protein tyrosine phosphorylation in human B cells after ligation of the beta 1 integrin VLA-4. *J Immunol.* 150, 1645-52.
- Frelinger, A. L., 3rd, et al., 1991. Monoclonal antibodies to ligand-occupied conformers of integrin alpha IIb beta 3 (glycoprotein IIb-IIIa) alter receptor affinity, specificity, and function. *J Biol Chem.* 266, 17106-11.
- Frisch, S. M., 1997. The epithelial cell default-phenotype hypothesis and its implications for cancer. *Bioessays.* 19, 705-9.
- Gallea, S., et al., 2001. Activation of mitogen-activated protein kinase cascades is involved in regulation of bone morphogenetic protein-2-induced osteoblast differentiation in pluripotent C2C12 cells. *Bone.* 28, 491-8.
- Gardner, H., et al., 1996. Deletion of integrin alpha 1 by homologous recombination permits normal murine development but gives rise to a specific deficit in cell adhesion. *Dev Biol.* 175, 301-13.
- Georges-Labouesse, E., et al., 1998. Essential role of alpha 6 integrins in cortical and retinal lamination. *Curr Biol.* 8, 983-6.
- Georges-Labouesse, E., et al., 1996. Absence of integrin alpha 6 leads to epidermolysis bullosa and neonatal death in mice. *Nat Genet.* 13, 370-3.
- Ghosh-Choudhury, N., et al., 2002. Requirement of BMP-2-induced phosphatidylinositol 3-kinase and Akt serine/threonine kinase in osteoblast differentiation and Smad-dependent BMP-2 gene transcription. *J Biol Chem.* 277, 33361-8.
- Giancotti, F. G., Ruoslahti, E., 1999. Integrin signaling. *Science.* 285, 1028-32.
- Girgert, R., et al., 2010. Integrin alpha2-deficient mice provide insights into specific functions of collagen receptors in the kidney. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 3, 19.
- Glass, D. A., 2nd, et al., 2005. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell.* 8, 751-64.
- Globus, R. K., et al., 2005. Skeletal phenotype of growing transgenic mice that express a function-perturbing form of beta1 integrin in osteoblasts. *Calcif Tissue Int.* 76, 39-49.
- Goh, K. L., et al., 1997. Mesodermal defects and cranial neural crest apoptosis in alpha5 integrin-null embryos. *Development.* 124, 4309-19.
- Goksoy, E., et al., 2008. Structural basis for the autoinhibition of talin in regulating integrin activation. *Mol Cell.* 31, 124-33.

- Gong, Y., et al., 2001. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell*. 107, 513-23.
- Gordon, J. A., et al., 2007. Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *Bone*. 41, 462-73.
- Grenache, D. G., et al., 2007. Wound healing in the alpha2beta1 integrin-deficient mouse: altered keratinocyte biology and dysregulated matrix metalloproteinase expression. *J Invest Dermatol*. 127, 455-66.
- Guicheux, J., et al., 2003. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun-NH2-terminal kinase by BMP-2 and their implication in the stimulation of osteoblastic cell differentiation. *J Bone Miner Res*. 18, 2060-8.
- Gunther, T., et al., 2005. Fhl2 deficiency results in osteopenia due to decreased activity of osteoblasts. *EMBO J*. 24, 3049-56.
- Hall, C. A., et al., 2010. Hippo pathway effector Yap is an ovarian cancer oncogene. *Cancer Res*. 70, 8517-25.
- Han, D. C., et al., 2001. Identification of a novel interaction between integrin beta1 and 14-3-3beta. *Oncogene*. 20, 346-57.
- Hannigan, G. E., et al., 1996. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature*. 379, 91-6.
- Hill, T. P., et al., 2005. Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell*. 8, 727-38.
- Hodivala-Dilke, K. M., et al., 1999. Beta3-integrin-deficient mice are a model for Glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival. *J Clin Invest*. 103, 229-38.
- Holmen, S. L., et al., 2005. Essential role of beta-catenin in postnatal bone acquisition. *J Biol Chem*. 280, 21162-8.
- Horwitz, A., et al., 1986. Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin--a transmembrane linkage. *Nature*. 320, 531-3.
- Howe, A. K., et al., 2002. Anchorage-dependent ERK signaling--mechanisms and consequences. *Curr Opin Genet Dev*. 12, 30-5.
- Howe, A. K., Juliano, R. L., 2000. Regulation of anchorage-dependent signal transduction by protein kinase A and p21-activated kinase. *Nat Cell Biol*. 2, 593-600.
- Hu, H., et al., 2005. Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development*. 132, 49-60.
- Huang, G., et al., 2009. Fibronectin binds and enhances the activity of bone morphogenetic protein 1. *J Biol Chem*. 284, 25879-88.
- Huang, G. S., et al., 2011. Spheroid formation of mesenchymal stem cells on chitosan and chitosan-hyaluronan membranes. *Biomaterials*. 32, 6929-45.
- Huang, W., et al., 2004. Osteopontin is a negative regulator of proliferation and differentiation in MC3T3-E1 pre-osteoblastic cells. *Bone*. 34, 799-808.
- Huang, X., et al., 2000a. Normal development, wound healing, and adenovirus susceptibility in beta5-deficient mice. *Mol Cell Biol*. 20, 755-9.
- Huang, X. Z., et al., 1996. Inactivation of the integrin beta 6 subunit gene reveals a role of epithelial integrins in regulating inflammation in the lung and skin. *J Cell Biol*. 133, 921-8.
- Huang, X. Z., et al., 2000b. Fatal bilateral chylothorax in mice lacking the integrin alpha9beta1. *Mol Cell Biol*. 20, 5208-15.
- Humphries, J. D., et al., 2006. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci*. 119, 3901-3.
- Humphries, M. J., et al., 2003. Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble. *Trends Biochem Sci*. 28, 313-20.
- Hunter, G. K., Goldberg, H. A., 1994. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Biochem J*. 302 (Pt 1), 175-9.
- Huveneers, S., et al., 2012. Vinculin associates with endothelial VE-cadherin junctions to control force-dependent remodeling. *J Cell Biol*. 196, 641-52.

- Hynes, R. O., 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 69, 11-25.
- Hynes, R. O., 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 110, 673-87.
- Hynes, R. O., 2009. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*. 326, 1216-9.
- Ishijima, M., et al., 2002. Resistance to unloading-induced three-dimensional bone loss in osteopontin-deficient mice. *J Bone Miner Res*. 17, 661-7.
- Ivaska, J., et al., 2002. Integrin alpha 2 beta 1 promotes activation of protein phosphatase 2A and dephosphorylation of Akt and glycogen synthase kinase 3 beta. *Mol Cell Biol*. 22, 1352-9.
- Iwaniec, U. T., et al., 2005. Effects of disrupted beta1-integrin function on the skeletal response to short-term hindlimb unloading in mice. *J Appl Physiol*. 98, 690-6.
- Jacob, A. L., et al., 2006. Fibroblast growth factor receptor 1 signaling in the osteo-chondrogenic cell lineage regulates sequential steps of osteoblast maturation. *Dev Biol*. 296, 315-28.
- James, M. F., et al., 2004. A NHERF binding site links the betaPDGFR to the cytoskeleton and regulates cell spreading and migration. *J Cell Sci*. 117, 2951-61.
- Jenkins, A. L., et al., 1998. Tyrosine phosphorylation of the beta3 cytoplasmic domain mediates integrin-cytoskeletal interactions. *J Biol Chem*. 273, 13878-85.
- Jensen, E. D., et al., 2009. Bone morphogenic protein 2 activates protein kinase D to regulate histone deacetylase 7 localization and repression of Runx2. *J Biol Chem*. 284, 2225-34.
- Jensen, E. D., et al., 2008. Histone deacetylase 7 associates with Runx2 and represses its activity during osteoblast maturation in a deacetylation-independent manner. *J Bone Miner Res*. 23, 361-72.
- Jikko, A., et al., 1999. Collagen integrin receptors regulate early osteoblast differentiation induced by BMP-2. *J Bone Miner Res*. 14, 1075-83.
- Kalaji, R., et al., 2012. ROCK1 and ROCK2 regulate epithelial polarisation and geometric cell shape. *Biol Cell*. 104, 435-51.
- Kamiya, N., et al., 2010. Wnt inhibitors Dkk1 and Sost are downstream targets of BMP signaling through the type IA receptor (BMPRIA) in osteoblasts. *J Bone Miner Res*. 25, 200-10.
- Kamiya, N., et al., 2008a. Disruption of BMP signaling in osteoblasts through type IA receptor (BMPRIA) increases bone mass. *J Bone Miner Res*. 23, 2007-17.
- Kamiya, N., et al., 2008b. BMP signaling negatively regulates bone mass through sclerostin by inhibiting the canonical Wnt pathway. *Development*. 135, 3801-11.
- Karaplis, A. C., et al., 1994. Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes Dev*. 8, 277-89.
- Karsenty, G., 2011. Bone endocrine regulation of energy metabolism and male reproduction. *C R Biol*. 334, 720-4.
- Karsenty, G., et al., 2009. Genetic control of bone formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 25, 629-48.
- Kato, M., et al., 2002. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol*. 157, 303-14.
- Kawamata, A., et al., 2011. Dok-1 and Dok-2 deficiency induces osteopenia via activation of osteoclasts. *J Cell Physiol*. 226, 3087-93.
- Khatiwala, C. B., et al., 2009. ECM compliance regulates osteogenesis by influencing MAPK signaling downstream of RhoA and ROCK. *J Bone Miner Res*. 24, 886-98.
- Khwaja, A., et al., 1997. Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *EMBO J*. 16, 2783-93.
- Kiema, T., et al., 2006. The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin. *Mol Cell*. 21, 337-47.
- Kim, J. B., et al., 2007. Reconciling the roles of FAK in osteoblast differentiation, osteoclast remodeling, and bone regeneration. *Bone*. 41, 39-51.
- Kim, M., et al., 2003. Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science*. 301, 1720-5.
- Kim, S. M., et al., 2004. Modulation of Thr phosphorylation of integrin beta1 during muscle differentiation. *J Biol Chem*. 279, 7082-90.

- Kinashi, T., et al., 2004. LAD-III, a leukocyte adhesion deficiency syndrome associated with defective Rap1 activation and impaired stabilization of integrin bonds. *Blood*. 103, 1033-6.
- Kloeker, S., et al., 2004. The Kindler syndrome protein is regulated by transforming growth factor-beta and involved in integrin-mediated adhesion. *J Biol Chem*. 279, 6824-33.
- Kolanus, W., et al., 1996. Alpha L beta 2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule. *Cell*. 86, 233-42.
- Kronenberg, H. M., 2003. Developmental regulation of the growth plate. *Nature*. 423, 332-6.
- Kuo, J. C., et al., 2011. Analysis of the myosin-II-responsive focal adhesion proteome reveals a role for beta-Pix in negative regulation of focal adhesion maturation. *Nat Cell Biol*. 13, 383-93.
- Lai, C. F., Cheng, S. L., 2005. Alphanbeta integrins play an essential role in BMP-2 induction of osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res*. 20, 330-40.
- Law, D. A., et al., 1996. Outside-in integrin signal transduction. Alpha IIb beta 3-(GP IIb IIIa) tyrosine phosphorylation induced by platelet aggregation. *J Biol Chem*. 271, 10811-5.
- Lee, H. J., et al., 2007. Polymorphisms and haplotypes of integrinalpha1 (ITGA1) are associated with bone mineral density and fracture risk in postmenopausal Koreans. *Bone*. 41, 979-86.
- Legate, K. R., Fassler, R., 2009. Mechanisms that regulate adaptor binding to beta-integrin cytoplasmic tails. *J Cell Sci*. 122, 187-98.
- Lemonnier, J., et al., 2004. Protein kinase C-independent activation of protein kinase D is involved in BMP-2-induced activation of stress mitogen-activated protein kinases JNK and p38 and osteoblastic cell differentiation. *J Biol Chem*. 279, 259-64.
- Leucht, P., et al., 2007. FAK-Mediated mechanotransduction in skeletal regeneration. *PLoS One*. 2, e390.
- Levy, D., et al., 2007. The Yes-associated protein 1 stabilizes p73 by preventing Itch-mediated ubiquitination of p73. *Cell Death Differ*. 14, 743-51.
- Li, N., et al., 2005. Beta1 integrins regulate mammary gland proliferation and maintain the integrity of mammary alveoli. *EMBO J*. 24, 1942-53.
- Liliental, J., Chang, D. D., 1998. Rack1, a receptor for activated protein kinase C, interacts with integrin beta subunit. *J Biol Chem*. 273, 2379-83.
- Lin, R. Z., et al., 2006. Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: roles of E-cadherin and beta1-integrin. *Cell Tissue Res*. 324, 411-22.
- Little, R. D., et al., 2002. A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am J Hum Genet*. 70, 11-9.
- Littlewood Evans, A., Muller, U., 2000. Stereocilia defects in the sensory hair cells of the inner ear in mice deficient in integrin alpha8beta1. *Nat Genet*. 24, 424-8.
- Liu, L., et al., 2012. The interaction between beta1 integrins and ERK1/2 in osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells under fluid shear stress modelled by a perfusion system. *J Tissue Eng Regen Med*.
- Liu, W., et al., 2013. Mechanism for KRIT1 Release of ICAP1-Mediated Suppression of Integrin Activation. *Mol Cell*.
- Liu, Z., et al., 2007. FGF18 is required for early chondrocyte proliferation, hypertrophy and vascular invasion of the growth plate. *Dev Biol*. 302, 80-91.
- Long, F., et al., 2004. Ihh signaling is directly required for the osteoblast lineage in the endochondral skeleton. *Development*. 131, 1309-18.
- Long, W., et al., 2010. SRC-3Delta4 mediates the interaction of EGFR with FAK to promote cell migration. *Mol Cell*. 37, 321-32.
- Lu, H., et al., 1997. LFA-1 is sufficient in mediating neutrophil emigration in Mac-1-deficient mice. *J Clin Invest*. 99, 1340-50.
- Lu, Z., Zreiqat, H., 2010. The osteoconductivity of biomaterials is regulated by bone morphogenetic protein 2 autocrine loop involving alpha2beta1 integrin and mitogen-activated protein kinase/extracellular related kinase signaling pathways. *Tissue Eng Part A*. 16, 3075-84.
- Luo, B. H., et al., 2007. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol*. 25, 619-47.

- Luo, B. H., et al., 2004. A specific interface between integrin transmembrane helices and affinity for ligand. *PLoS Biol.* 2, e153.
- Mackinnon, A. C., et al., 2002. C. elegans PAT-4/ILK functions as an adaptor protein within integrin adhesion complexes. *Curr Biol.* 12, 787-97.
- Maes, C., et al., 2010a. Increased skeletal VEGF enhances beta-catenin activity and results in excessively ossified bones. *EMBO J.* 29, 424-41.
- Maes, C., et al., 2010b. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Dev Cell.* 19, 329-44.
- Maile, L. A., et al., 2011. An essential role for the association of CD47 to SHPS-1 in skeletal remodeling. *J Bone Miner Res.* 26, 2068-81.
- Malaval, L., et al., 2008. Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis. *J Exp Med.* 205, 1145-53.
- Mao, Y., Schwarzbauer, J. E., 2005. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biol.* 24, 389-99.
- Margadant, C., et al., 2012. Distinct roles of talin and kindlin in regulating integrin alpha5beta1 function and trafficking. *Curr Biol.* 22, 1554-63.
- Margadant, C., et al., 2011. Mechanisms of integrin activation and trafficking. *Curr Opin Cell Biol.* 23, 607-14.
- Martel, V., et al., 2001. Conformation, localization, and integrin binding of talin depend on its interaction with phosphoinositides. *J Biol Chem.* 276, 21217-27.
- Martinez-Rico, C., et al., 2010. Integrins stimulate E-cadherin-mediated intercellular adhesion by regulating Src-kinase activation and actomyosin contractility. *J Cell Sci.* 123, 712-22.
- Marzia, M., et al., 2000. Decreased c-Src expression enhances osteoblast differentiation and bone formation. *J Cell Biol.* 151, 311-20.
- Matsushita, T., et al., 2009. Extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) and ERK2 play essential roles in osteoblast differentiation and in supporting osteoclastogenesis. *Mol Cell Biol.* 29, 5843-57.
- Mayer, U., et al., 1997. Absence of integrin alpha 7 causes a novel form of muscular dystrophy. *Nat Genet.* 17, 318-23.
- McClatchey, A. I., et al., 1998. Mice heterozygous for a mutation at the Nf2 tumor suppressor locus develop a range of highly metastatic tumors. *Genes Dev.* 12, 1121-33.
- McClatchey, A. I., et al., 1997. The Nf2 tumor suppressor gene product is essential for extraembryonic development immediately prior to gastrulation. *Genes Dev.* 11, 1253-65.
- McCleverty, C. J., et al., 2007. Structure of the PTB domain of tensin1 and a model for its recruitment to fibrillar adhesions. *Protein Sci.* 16, 1223-9.
- McDonald, J. A., et al., 1982. Role of fibronectin in collagen deposition: Fab' to the gelatin-binding domain of fibronectin inhibits both fibronectin and collagen organization in fibroblast extracellular matrix. *J Cell Biol.* 92, 485-92.
- McHugh, K. P., et al., 2000. Mice lacking beta3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. *J Clin Invest.* 105, 433-40.
- Medeiros, R. B., et al., 2005. Protein kinase D1 and the beta 1 integrin cytoplasmic domain control beta 1 integrin function via regulation of Rap1 activation. *Immunity.* 23, 213-26.
- Miao, D., et al., 2005. Osteoblast-derived PTHrP is a potent endogenous bone anabolic agent that modifies the therapeutic efficacy of administered PTH 1-34. *J Clin Invest.* 115, 2402-11.
- Millon-Fremillon, A., et al., 2008. Cell adaptive response to extracellular matrix density is controlled by ICAP-1-dependent beta1-integrin affinity. *J Cell Biol.* 180, 427-41.
- Mishina, Y., et al., 2004. Bone morphogenetic protein type IA receptor signaling regulates postnatal osteoblast function and bone remodeling. *J Biol Chem.* 279, 27560-6.
- Miura, Y., et al., 2005. Defective osteogenesis of the stromal stem cells predisposes CD18-null mice to osteoporosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 14022-7.
- Monkley, S. J., et al., 2000. Disruption of the talin gene arrests mouse development at the gastrulation stage. *Dev Dyn.* 219, 560-74.

- Montanez, E., et al., 2008. Kindlin-2 controls bidirectional signaling of integrins. *Genes Dev.* 22, 1325-30.
- Montero, A., et al., 2000. Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation. *J Clin Invest.* 105, 1085-93.
- Moser, M., et al., 2008. Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nat Med.* 14, 325-30.
- Mould, A. P., et al., 1995. Regulation of integrin alpha 5 beta 1-fibronectin interactions by divalent cations. Evidence for distinct classes of binding sites for Mn²⁺, Mg²⁺, and Ca²⁺. *J Biol Chem.* 270, 26270-7.
- Moursi, A. M., et al., 1996. Fibronectin regulates calvarial osteoblast differentiation. *J Cell Sci.* 109 (Pt 6), 1369-80.
- Moursi, A. M., et al., 1997. Interactions between integrin receptors and fibronectin are required for calvarial osteoblast differentiation in vitro. *J Cell Sci.* 110 (Pt 18), 2187-96.
- Muller, U., et al., 1997. Integrin alpha8beta1 is critically important for epithelial-mesenchymal interactions during kidney morphogenesis. *Cell.* 88, 603-13.
- Munger, J. S., et al., 1999. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell.* 96, 319-28.
- Nelson, C. M., et al., 2004. Vascular endothelial-cadherin regulates cytoskeletal tension, cell spreading, and focal adhesions by stimulating RhoA. *Mol Biol Cell.* 15, 2943-53.
- Nesti, L. J., et al., 2002. TGF-beta1 calcium signaling increases alpha5 integrin expression in osteoblasts. *J Orthop Res.* 20, 1042-9.
- Nobes, C. D., Hall, A., 1995. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell.* 81, 53-62.
- Norambuena, A., Schwartz, M. A., 2011. Effects of integrin-mediated cell adhesion on plasma membrane lipid raft components and signaling. *Mol Biol Cell.* 22, 3456-64.
- Obremski, V. J., et al., 1998. Merlin, the neurofibromatosis type 2 gene product, and beta1 integrin associate in isolated and differentiating Schwann cells. *J Neurobiol.* 37, 487-501.
- Ogata, N., et al., 2000. Insulin receptor substrate-1 in osteoblast is indispensable for maintaining bone turnover. *J Clin Invest.* 105, 935-43.
- Oh, H., Irvine, K. D., 2008. In vivo regulation of Yorkie phosphorylation and localization. *Development.* 135, 1081-8.
- Ohbayashi, N., et al., 2002. FGF18 is required for normal cell proliferation and differentiation during osteogenesis and chondrogenesis. *Genes Dev.* 16, 870-9.
- Olsen, B. R., et al., 2000. Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 16, 191-220.
- Ono, N., et al., 2008. Osteopontin negatively regulates parathyroid hormone receptor signaling in osteoblasts. *J Biol Chem.* 283, 19400-9.
- Otey, C. A., et al., 1990. An interaction between alpha-actinin and the beta 1 integrin subunit in vitro. *J Cell Biol.* 111, 721-9.
- Otey, C. A., et al., 1993. Mapping of the alpha-actinin binding site within the beta 1 integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* 268, 21193-7.
- Oxley, C. L., et al., 2008. An integrin phosphorylation switch: the effect of beta3 integrin tail phosphorylation on Dok1 and talin binding. *J Biol Chem.* 283, 5420-6.
- Pankov, R., et al., 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.
- Park, S. J., et al., 2011. The forkhead transcription factor Foxc2 promotes osteoblastogenesis via up-regulation of integrin beta1 expression. *Bone.* 49, 428-38.
- Pavalko, F. M., LaRoche, S. M., 1993. Activation of human neutrophils induces an interaction between the integrin beta 2-subunit (CD18) and the actin binding protein alpha-actinin. *J Immunol.* 151, 3795-807.
- Pentikainen, U., Ylanne, J., 2009. The regulation mechanism for the auto-inhibition of binding of human filamin A to integrin. *J Mol Biol.* 393, 644-57.

- Pfaff, M., et al., 1998. Integrin beta cytoplasmic domains differentially bind to cytoskeletal proteins. *J Biol Chem.* 273, 6104-9.
- Phillips, J. A., et al., 2008. Role for beta1 integrins in cortical osteocytes during acute musculoskeletal disuse. *Matrix Biol.* 27, 609-18.
- Popova, S. N., et al., 2007. Alpha11 beta1 integrin-dependent regulation of periodontal ligament function in the erupting mouse incisor. *Mol Cell Biol.* 27, 4306-16.
- Postel, E. H., et al., 1993. Human c-myc transcription factor PuF identified as nm23-H2 nucleoside diphosphate kinase, a candidate suppressor of tumor metastasis. *Science.* 261, 478-80.
- Pozzi, A., et al., 1998. Integrin alpha1beta1 mediates a unique collagen-dependent proliferation pathway in vivo. *J Cell Biol.* 142, 587-94.
- Pytela, R., et al., 1985. Identification and isolation of a 140 kd cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor. *Cell.* 40, 191-8.
- Quelo, I., et al., 2004. Integrin-linked kinase regulates the nuclear entry of the c-Jun coactivator alpha-NAC and its coactivation potency. *J Biol Chem.* 279, 43893-9.
- Rantala, J. K., et al., 2011. SHARPIN is an endogenous inhibitor of beta1-integrin activation. *Nat Cell Biol.* 13, 1315-24.
- Reddy, K. B., et al., 1998. Identification of an interaction between the m-band protein skelemin and beta-integrin subunits. Colocalization of a skelemin-like protein with beta1- and beta3-integrins in non-muscle cells. *J Biol Chem.* 273, 35039-47.
- Ren, B., et al., 2004. The virulence function of *Streptococcus pneumoniae* surface protein A involves inhibition of complement activation and impairment of complement receptor-mediated protection. *J Immunol.* 173, 7506-12.
- Rietzler, M., et al., 1998. The human WD repeat protein WAIT-1 specifically interacts with the cytoplasmic tails of beta7-integrins. *J Biol Chem.* 273, 27459-66.
- Rittling, S. R., et al., 1998. Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro. *J Bone Miner Res.* 13, 1101-11.
- Roberts, M. S., et al., 2004. Protein kinase B/Akt acts via glycogen synthase kinase 3 to regulate recycling of alpha v beta 3 and alpha 5 beta 1 integrins. *Mol Cell Biol.* 24, 1505-15.
- Rodda, S. J., McMahon, A. P., 2006. Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. *Development.* 133, 3231-44.
- Sajid, M., et al., 2000. Protein complexes involving alpha v beta 3 integrins, nonmuscle myosin heavy chain-A, and focal adhesion kinase from in thrombospondin-treated smooth muscle cells. *J Investig Med.* 48, 190-7.
- Sakai, T., et al., 1998. Modulation of beta1A integrin functions by tyrosine residues in the beta1 cytoplasmic domain. *J Cell Biol.* 141, 527-38.
- Samson, T., et al., 2004. The LIM-only proteins FHL2 and FHL3 interact with alpha- and beta-subunits of the muscle alpha7beta1 integrin receptor. *J Biol Chem.* 279, 28641-52.
- Schaller, M. D., et al., 1995. Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *J Cell Biol.* 130, 1181-7.
- Schlaepfer, D. D., Hunter, T., 1998. Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs? *Trends Cell Biol.* 8, 151-7.
- Schlegelmilch, K., et al., 2011. Yap1 acts downstream of alpha-catenin to control epidermal proliferation. *Cell.* 144, 782-95.
- Schmits, R., et al., 1996. LFA-1-deficient mice show normal CTL responses to virus but fail to reject immunogenic tumor. *J Exp Med.* 183, 1415-26.
- Schneider, J. G., et al., 2011. Integrins and bone metastasis: integrating tumor cell and stromal cell interactions. *Bone.* 48, 54-65.
- Schwartz, M. A., Assoian, R. K., 2001. Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. *J Cell Sci.* 114, 2553-60.
- Shapses, S. A., et al., 2003. Osteopontin facilitates bone resorption, decreasing bone mineral crystallinity and content during calcium deficiency. *Calcif Tissue Int.* 73, 86-92.

- Shattil, S. J., et al., 2010. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11, 288-300.
- Shattil, S. J., et al., 1995. Beta 3-endonexin, a novel polypeptide that interacts specifically with the cytoplasmic tail of the integrin beta 3 subunit. *J Cell Biol.* 131, 807-16.
- Shier, P., et al., 1996. Impaired immune responses toward alloantigens and tumor cells but normal thymic selection in mice deficient in the beta2 integrin leukocyte function-associated antigen-1. *J Immunol.* 157, 5375-86.
- Shih, Y. R., et al., 2011. Matrix stiffness regulation of integrin-mediated mechanotransduction during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res.* 26, 730-8.
- Sieg, D. J., et al., 2000. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol.* 2, 249-56.
- Soriano, P., et al., 1991. Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell.* 64, 693-702.
- Stanchi, F., et al., 2009. Molecular dissection of the ILK-PINCH-parvin triad reveals a fundamental role for the ILK kinase domain in the late stages of focal-adhesion maturation. *J Cell Sci.* 122, 1800-11.
- Steinhardt, A. A., et al., 2008. Expression of Yes-associated protein in common solid tumors. *Hum Pathol.* 39, 1582-9.
- Stemmer-Rachamimov, A. O., et al., 1998. Loss of the NF2 gene and merlin occur by the tumorlet stage of schwannoma development in neurofibromatosis 2. *J Neuropathol Exp Neurol.* 57, 1164-7.
- Stephens, L. E., et al., 1995. Deletion of beta 1 integrins in mice results in inner cell mass failure and peri-implantation lethality. *Genes Dev.* 9, 1883-95.
- Stoker, M., et al., 1968. Anchorage and growth regulation in normal and virus-transformed cells. *Int J Cancer.* 3, 683-93.
- Streuli, C. H., Akhtar, N., 2009. Signal co-operation between integrins and other receptor systems. *Biochem J.* 418, 491-506.
- Stroeken, P. J., et al., 2006. Integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 (ICAP-1) interacts with the ROCK-I kinase at the plasma membrane. *J Cell Physiol.* 208, 620-8.
- Stupack, D. G., Cheresch, D. A., 2002. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J Cell Sci.* 115, 3729-38.
- Su, J. L., et al., 2010. CYR61 regulates BMP-2-dependent osteoblast differentiation through the $\{\alpha\}\{\beta\}3$ integrin/integrin-linked kinase/ERK pathway. *J Biol Chem.* 285, 31325-36.
- Swaney, J. S., et al., 2006. Focal adhesions in (myo)fibroblasts scaffold adenylyl cyclase with phosphorylated caveolin. *J Biol Chem.* 281, 17173-9.
- Tan, X., et al., 2007. Smad4 is required for maintaining normal murine postnatal bone homeostasis. *J Cell Sci.* 120, 2162-70.
- Tang, S., et al., 1999. Enhancement of endothelial cell migration and in vitro tube formation by TAP20, a novel beta 5 integrin-modulating, PKC theta-dependent protein. *J Cell Biol.* 147, 1073-84.
- Tang, Y., et al., 2009. TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat Med.* 15, 757-65.
- Tronik-Le Roux, D., et al., 2000. Thrombasthenic mice generated by replacement of the integrin alpha(IIB) gene: demonstration that transcriptional activation of this megakaryocytic locus precedes lineage commitment. *Blood.* 96, 1399-408.
- Tsumura, H., et al., 2003. The targeted disruption of the CD98 gene results in embryonic lethality. *Biochem Biophys Res Commun.* 308, 847-51.
- Tu, X., et al., 2011. Indian hedgehog requires additional effectors besides Runx2 to induce osteoblast differentiation. *Dev Biol.* 362, 76-82.
- Tu, X., et al., 2007. Noncanonical Wnt signaling through G protein-linked PKCdelta activation promotes bone formation. *Dev Cell.* 12, 113-27.

- Tu, Y., et al., 2003. Migfilin and Mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation. *Cell*. 113, 37-47.
- Ussar, S., et al., 2008. Loss of Kindlin-1 causes skin atrophy and lethal neonatal intestinal epithelial dysfunction. *PLoS Genet*. 4, e1000289.
- Ussar, S., et al., 2006. The Kindlins: subcellular localization and expression during murine development. *Exp Cell Res*. 312, 3142-51.
- Valverde-Franco, G., et al., 2004. Defective bone mineralization and osteopenia in young adult FGFR3^{-/-} mice. *Hum Mol Genet*. 13, 271-84.
- van der Flier, A., et al., 2010. Endothelial alpha5 and alphav integrins cooperate in remodeling of the vasculature during development. *Development*. 137, 2439-49.
- van der Neut, R., et al., 1996. Epithelial detachment due to absence of hemidesmosomes in integrin beta 4 null mice. *Nat Genet*. 13, 366-9.
- Viguet-Carrin, S., et al., 2006. The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int*. 17, 319-36.
- Vuori, K., Ruoslahti, E., 1994. Association of insulin receptor substrate-1 with integrins. *Science*. 266, 1576-8.
- Wada, K., et al., 2011. Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development*. 138, 3907-14.
- Wade-Gueye, N. M., et al., 2012. Absence of bone sialoprotein (BSP) impairs primary bone formation and resorption: the marrow ablation model under PTH challenge. *Bone*. 50, 1064-73.
- Wagner, N., et al., 1996. Critical role for beta7 integrins in formation of the gut-associated lymphoid tissue. *Nature*. 382, 366-70.
- Walker, J. L., Assoian, R. K., 2005. Integrin-dependent signal transduction regulating cyclin D1 expression and G1 phase cell cycle progression. *Cancer Metastasis Rev*. 24, 383-93.
- Wang, L., et al., 2006. Integrin beta1 silencing in osteoblasts alters substrate-dependent responses to 1,25-dihydroxy vitamin D3. *Biomaterials*. 27, 3716-25.
- Wang, Z., et al., 2010. RGD-independent cell adhesion via a tissue transglutaminase-fibronectin matrix promotes fibronectin fibril deposition and requires syndecan-4/2 and {alpha}5{beta}1 integrin co-signaling. *J Biol Chem*. 285, 40212-29.
- Wayner, E. A., et al., 1991. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 contribute to cell attachment to vitronectin but differentially distribute on the cell surface. *J Cell Biol*. 113, 919-29.
- White, D. E., et al., 2004. Targeted disruption of beta1-integrin in a transgenic mouse model of human breast cancer reveals an essential role in mammary tumor induction. *Cancer Cell*. 6, 159-70.
- Whitehead, K. J., et al., 2004. Ccm1 is required for arterial morphogenesis: implications for the etiology of human cavernous malformations. *Development*. 131, 1437-48.
- Wickstrom, S. A., et al., 2010. Integrin-linked kinase controls microtubule dynamics required for plasma membrane targeting of caveolae. *Dev Cell*. 19, 574-88.
- Williams, T. M., Lisanti, M. P., 2005. Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 288, C494-506.
- Wilson, R. W., et al., 1993. Gene targeting yields a CD18-mutant mouse for study of inflammation. *J Immunol*. 151, 1571-8.
- Wixler, V., et al., 1999. Identification of novel interaction partners for the conserved membrane proximal region of alpha-integrin cytoplasmic domains. *FEBS Lett*. 445, 351-5.
- Woods, A. J., et al., 2004. PKD1/PKCmu promotes alphavbeta3 integrin recycling and delivery to nascent focal adhesions. *EMBO J*. 23, 2531-43.
- Worth, D. C., et al., 2010. Alpha v beta3 integrin spatially regulates VASP and RIAM to control adhesion dynamics and migration. *J Cell Biol*. 189, 369-83.
- Worth, D. C., Parsons, M., 2008. Adhesion dynamics: mechanisms and measurements. *Int J Biochem Cell Biol*. 40, 2397-409.
- Wu, H., et al., 2004. Deficiency of CD11b or CD11d results in reduced staphylococcal enterotoxin-induced T cell response and T cell phenotypic changes. *J Immunol*. 173, 297-306.

- Xia, T., et al., 2011. Loss-of-function of SHARPIN causes an osteopenic phenotype in mice. *Endocrine*. 39, 104-12.
- Xiao, Z., et al., 2011. Conditional deletion of Pkd1 in osteocytes disrupts skeletal mechanosensing in mice. *FASEB J.* 25, 2418-32.
- Xiao, Z., et al., 2009. Conditional disruption of Pkd1 in osteoblasts results in osteopenia due to direct impairment of bone formation. *J Biol Chem.* 285, 1177-87.
- Xiao, Z., et al., 2010. Conditional disruption of Pkd1 in osteoblasts results in osteopenia due to direct impairment of bone formation. *J Biol Chem.* 285, 1177-87.
- Yamada, K. M., et al., 2003. Dimensions and dynamics in integrin function. *Braz J Med Biol Res.* 36, 959-66.
- Yan, B., et al., 2001. Calpain cleavage promotes talin binding to the beta 3 integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* 276, 28164-70.
- Yang, J. T., et al., 1996. Genetic analysis of alpha 4 integrin functions in the development of mouse skeletal muscle. *J Cell Biol.* 135, 829-35.
- Yang, J. T., et al., 1993. Embryonic mesodermal defects in alpha 5 integrin-deficient mice. *Development.* 119, 1093-105.
- Yang, J. T., et al., 1995. Cell adhesion events mediated by alpha 4 integrins are essential in placental and cardiac development. *Development.* 121, 549-60.
- Yang, N., et al., 2011. alpha-Actinin-3 deficiency is associated with reduced bone mass in human and mouse. *Bone.* 49, 790-8.
- Ye, F., et al., 2011. Molecular mechanism of inside-out integrin regulation. *J Thromb Haemost.* 9 Suppl 1, 20-5.
- Yeh, C. R., et al., 2010. Estrogen augments shear stress-induced signaling and gene expression in osteoblast-like cells via estrogen receptor-mediated expression of beta1-integrin. *J Bone Miner Res.* 25, 627-39.
- Yu, F. X., et al., 2012. Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell.* 150, 780-91.
- Yu, K., et al., 2003. Conditional inactivation of FGF receptor 2 reveals an essential role for FGF signaling in the regulation of osteoblast function and bone growth. *Development.* 130, 3063-74.
- Yurochko, A. D., et al., 1992. Integrins as a primary signal transduction molecule regulating monocyte immediate-early gene induction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 9034-8.
- Zaidi, S. K., et al., 2004. Tyrosine phosphorylation controls Runx2-mediated subnuclear targeting of YAP to repress transcription. *EMBO J.* 23, 790-9.
- Zawistowski, J. S., et al., 2005. CCM1 and CCM2 protein interactions in cell signaling: implications for cerebral cavernous malformations pathogenesis. *Hum Mol Genet.* 14, 2521-31.
- Zemmyo, M., et al., 2003. Accelerated, aging-dependent development of osteoarthritis in alpha1 integrin-deficient mice. *Arthritis Rheum.* 48, 2873-80.
- Zent, R., et al., 2000. Class- and splice variant-specific association of CD98 with integrin beta cytoplasmic domains. *J Biol Chem.* 275, 5059-64.
- Zhang, H., et al., 2004. Myosin-X provides a motor-based link between integrins and the cytoskeleton. *Nat Cell Biol.* 6, 523-31.
- Zhang, J., et al., 2001. Interaction between krit1 and icap1alpha infers perturbation of integrin beta1-mediated angiogenesis in the pathogenesis of cerebral cavernous malformation. *Hum Mol Genet.* 10, 2953-60.
- Zhang, X., et al., 2009. beta1 integrin is necessary for ureteric bud branching morphogenesis and maintenance of collecting duct structural integrity. *Development.* 136, 3357-66.
- Zhang, X. A., Hemler, M. E., 1999. Interaction of the integrin beta1 cytoplasmic domain with ICAP-1 protein. *J Biol Chem.* 274, 11-9.
- Zhang, Y., et al., 2012. Phactr4 regulates directional migration of enteric neural crest through PP1, integrin signaling, and cofilin activity. *Genes Dev.* 26, 69-81.

- Zhang, Z., et al., 1995. The alpha 5 beta 1 integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 6161-5.
- Zhao, B., et al., 2012. Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes Dev.* 26, 54-68.
- Zhao, B., et al., 2011. The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nat Cell Biol.* 13, 877-83.
- Zhao, B., et al., 2008. TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev.* 22, 1962-71.
- Zhao, H., et al., 2005. Unoccupied alpha(v)beta3 integrin regulates osteoclast apoptosis by transmitting a positive death signal. *Mol Endocrinol.* 19, 771-80.
- Zhong, C., et al., 1998. Rho-mediated contractility exposes a cryptic site in fibronectin and induces fibronectin matrix assembly. *J Cell Biol.* 141, 539-51.
- Zhou, X., et al., 2007. Filamin B deficiency in mice results in skeletal malformations and impaired microvascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 3919-24.
- Zhu, J., et al., 2002. beta8 integrins are required for vascular morphogenesis in mouse embryos. *Development.* 129, 2891-903.
- Zimmerman, D., et al., 2000. Impaired bone formation in transgenic mice resulting from altered integrin function in osteoblasts. *Dev Biol.* 220, 2-15.
- Zovein, A. C., et al., 2010. Beta1 integrin establishes endothelial cell polarity and arteriolar lumen formation via a Par3-dependent mechanism. *Dev Cell.* 18, 39-51.
- Zutter, M. M., et al., 1995. Re-expression of the alpha 2 beta 1 integrin abrogates the malignant phenotype of breast carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 7411-5.

TABLE DES ABBRÉVIATIONS

α SMA : α -smooth muscle actin
aa : acide aminé
ALP : la phosphatase alcaline
ATF4 : activating transcription factor 4
BCA : l'acide bicinchoninique
BMP : bone morphogenetic protein
BrdU : 5-bromo-2'-deoxyuridine
BSA : albumine de sérum bovin
BSP : bone sialoprotéine
CamKII : Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II
CCM : Cerebral Cavernous Malformation
Col I : collagène de type I
CSM : cellules souches mésenchymateuses
CTGF : connective tissue growth factor
DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole
domaine PTB : phosphotyrosine-binding domain
EDTA : éthylènediamine-tétracétique
EGF : Epidermal Growth Factor
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
ERK : Extracellular signal-regulated kinase
ERM : ezrin/radixin/moesin
FAK : focal associated kinase
FGF : fibroblast growth factor
FN : fibronectine
GDI : Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor
GPCR : G protein-coupled receptor
Grb2 : growth factor receptor-bound protein 2
HH : Hedgehog
HRP : HorseRadish peroxidase
IGF : insulin-like growth factor
IHH : Indian Hedgehog
ILK : integrin-linked kinase
JNK : c-Jun N-terminal kinase
KO : Knock-out
Krit-1 : K-rev interaction trapped-1
 μ CT : micro-computed tomography
MAPK : MAP kinase
MEC : Matrice extracellulaire
N : asparagine
NHERF : Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor
OCN : ostéocalcine
OPN : ostéopontine
Osx : Ostérix
p21 activated kinases (PAKs
PBS : tampon phosphate
PFA : paraformaldéhyde
Pi3K : phosphoinositide 3-kinase
PKA : protéine kinase A
PKC : protéine kinase C
pQCT : peripheral quantitative computer tomography
PTCH1 : Patched homologue1
PTH : Hormone Parathyroïde
PTHrP : Parathyroid hormone-related peptide
SDS : dodécyl-sulfate de sodium
Ser : sérine
SHARPIN : SHANK-Associated RH Domain Interacting Protein

SMO : Smoothened

SOS : son of sevenless

SV40 : Simian Virus 40

SVF : sérum de veau foetal

TBS : Tris-buffered saline

TGF β : transforming growth factor β

Thr : thréonine

TRAP : phosphatase alcaline tartrate
résistante

Tris : trishydroxyméthylaminométhane

VCAM : vascular cell adhesion molecule

VEGF : vascular endothelial growth factor

VEGFR : vascular endothelial growth factor
receptor

Y : tyrosine

YAP : Yes-associated protein

L'intégrine $\beta 1$ et de son régulateur ICAP-1 α dans l'ostéogenèse : rôle dans la prolifération, la différenciation et la fonction ostéoblastique.

L'intégrine $\beta 1$ appartient à une large famille de récepteurs de première importance pour les interactions cellule/matrice extracellulaire. La délétion spécifique d'un régulateur négatif de l'intégrine $\beta 1$, ICAP-1 α , induit de sévères défauts osseux. Nous avons pu montrer que la perte d'ICAP-1 α est accompagnée d'une augmentation de l'activité de l'intégrine $\beta 1$, affectant le dépôt des matrices de fibronectine et de collagène de type I. De plus, nous avons pu montrer qu'ICAP-1 α a une action antagoniste sur le recrutement de la kindline-2 au niveau du domaine cytoplasmique de l'intégrine $\beta 1$ (Brunner et al. JCB 2011). Nous nous sommes ensuite intéressés au rôle de l'intégrine $\beta 1$ elle-même dans l'ostéogenèse afin de comprendre comment les ostéoblastes intègrent les signaux du microenvironnement pour coordonner la formation et le remodelage osseux. Dans cette optique, nous avons généré un modèle de souris délétées pour l'intégrine $\beta 1$ spécifiquement dans les ostéoblastes en cours de maturation. Ces souris présentent un sévère phénotype osseux caractérisé par des réductions importantes de la minéralisation et de la dynamique osseuse, ainsi que des déformations osseuses et des fractures rappelant le syndrome d'Ostéoporose Juvénile. L'analyse *in vitro* d'ostéoblastes n'exprimant pas l'intégrine $\beta 1$ a révélé un défaut majeur de prolifération impliquant non pas la voie canonique MAPK/ERK mais plutôt un défaut d'activation du co-facteur de transcription YAP. De plus, nous avons pu montrer que les intégrines $\beta 1$ régulaient le niveau d'AMP cyclique (AMPC) dans les ostéoblastes et que ceci était corrélé à l'inactivation de YAP. De même, nous avons pu relier l'inactivation de YAP au processus d'endocytose. Finalement, des analyses *in vivo* et *in vitro* ont révélé un défaut fonctionnel des ostéoblastes dépourvus d'intégrine $\beta 1$. Nous avons pu montrer que cette incapacité fonctionnelle était due à une réduction de la réponse au BMP-2, facteur de croissance ostéoblastique majeur, non pas au niveau de son récepteur mais probablement au niveau de l'activation des promoteurs dépendants des BMP. Nos résultats montrent ainsi que l'intégrine $\beta 1$ est un régulateur clé de la prolifération ostéoblastique dépendante de YAP et de la signalisation BMP régulant la fonction ostéoblastique, la minéralisation et la formation osseuse.

Mots clés : Intégrine $\beta 1$, ICAP-1 α , YAP, BMP-2, Ostéoblaste, Matrice extracellulaire

$\beta 1$ integrin and its regulator ICAP-1 α functions during osteogenesis : implication for osteoblast proliferation, differentiation and function.

$\beta 1$ integrins belong to a large family of receptors that have been shown to be of paramount importance for cell/extracellular matrix interactions. The ablation of the specific $\beta 1$ integrin regulator ICAP-1 α results in severe bone and mineralization defects. By combining mouse and cell biology we could demonstrate that loss of ICAP-1 α was accompanied by an increase of $\beta 1$ integrin activity that affects fibronectin and collagen deposition. Moreover, we could show that ICAP-1 is an important negative regulator of kindlin-2 recruitment on $\beta 1$ integrin cytoplasmic domain (Brunner et al. JCB 2011). We then wanted to address the functional role of $\beta 1$ integrin per se in osteogenesis and to understand how osteoblasts integrate environmental cues to coordinate bone formation and remodeling. For this we generated osteoblast specific $\beta 1$ integrin deficient mice. These mice showed severe bone defects characterized by reduced bone mineralization and dynamic, as well as bending and fractures reminding human Juvenile Osteoporosis symptoms. *In vitro* analyses of $\beta 1$ integrin deficient osteoblasts revealed proliferation defect which is not due to defective canonical MAPK/ERK pathway, but rather to defective activity of the co-transcription factor YAP. Then, we showed that $\beta 1$ integrins are regulating cAMP level in osteoblasts and that the cAMP level correlates with YAP inactivation. We also linked YAP inactivation with raft endocytosis. Finally, *in vivo* and *in vitro* analyses revealed a functional incapacity of $\beta 1$ integrin deficient osteoprecursors. We could show that the lazy phenotype of $\beta 1$ integrin deficient osteoblasts is likely due to a reduced response to BMP signaling, a major osteoblast growth factor. Taken together, our findings demonstrate that $\beta 1$ integrin is a key regulator of YAP-dependent osteoblast proliferation and BMP signaling allowing osteoblast functionality, mineralization and bone formation.

Key words : $\beta 1$ integrin, ICAP-1 α , YAP, BMP-2, Osteoblast, Extracellular matrix

