

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE
Faculté de génie
Département de génie chimique et de génie biotechnologique

INFLUENCE D'UN FILM DE POLYCAPROLACTONE FONCTIONNALISÉ PAR DES
PEPTIDES D'ADHÉSION SUR LA RÉPONSE DE PRÉOSTÉOBLASTES À LA BMP-2
ET À LA BMP-9

Thèse de doctorat

Spécialité : Génie chimique et génie biotechnologique

Monsieur Olivier DREVELLE

Jury : Professeure Nathalie FAUCHEUX (Directrice)
Professeure Sophie LEROUGE
Professeur Denis GROLEAU
Professeur Gaétan LAROCHE
Professeur Bernard MARCOS
Professeur Joël SIROIS



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-96316-6

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-96316-6

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

Qui ose vaincra

Devise des parachutistes de la France Libre

Résumé

L'efficacité des matériaux utilisés pour favoriser la régénération osseuse dépend entre autres de leur capacité d'interaction avec le tissu environnant. Ainsi, des peptides d'adhésion contenant la séquence Arginine-Glycine-Acide aspartique (RGD) sont parmi les plus utilisés pour favoriser l'attachement des cellules osseuses au matériau. Les facteurs de croissance, dont les protéines morphogénétiques osseuses (BMPs), jouent également un rôle clé dans le processus de différenciation et de fonctionnement des cellules osseuses. La BMP-2 approuvée par la *Food and Drug Administration* aux États-Unis dans le cadre d'un système de libération est déjà actuellement utilisée cliniquement pour accroître la régénération osseuse. De plus, la BMP-9 a récemment suscité un grand intérêt en raison de son potentiel ostéogénique supérieur à celui de la BMP-2.

Néanmoins, peu d'études se sont intéressées à l'influence des peptides d'adhésion sur la réponse cellulaire aux BMPs. Le principal objectif de ce travail de doctorat a donc été de fonctionnaliser un polymère par des peptides d'adhésion et de déterminer son impact sur la capacité de préostéoblastes de souris MC3T3-E1 à répondre à la BMP-2 et à la BMP-9. Cette étude s'est tout d'abord intéressée à la synthèse et à la caractérisation d'un film de polycaprolactone (PCL) fonctionnalisé par un peptide dérivé de la sialoprotéine osseuse qui contient 15 acides aminés dont la séquence RGD (pRGD). La fonctionnalisation a consisté en une hydrolyse alcaline du film PCL suivie d'un greffage covalent du pRGD. Les films PCL hydrolysés ont adsorbé des protéines sériques adhésives fibronectine et vitronectine mais sans favoriser l'étalement des préostéoblastes MC3T3-E1. En absence de sérum, les films PCL-pRGD ont permis un étalement plus important des préostéoblastes MC3T3-E1 par rapport au PCL fonctionnalisé par le pRGE (peptide négatif) ou au PCL hydrolysé. Le PCL-pRGD a augmenté le niveau de phosphorylation de la FAK (Tyr³⁹⁷), évènement nécessaire chez les préostéoblastes murins pour permettre leur différenciation en ostéoblastes matures. Ainsi, seules les cellules adhérant au PCL-pRGD ont répondu à la BMP-2 *via* une activation de la voie canonique des Smads.

Dans un deuxième temps, la stimulation des préostéoblastes par la BMP-2 et/ou BMP-9 a été déterminée sur PCL-pRGD. L' EC_{50} pour chacune des BMPs a tout d'abord été évaluée afin de choisir la concentration optimale à utiliser lors de la combinaison des BMP-2/BMP-9. Tandis que la BMP-2 a induit une phosphorylation des Smad1/5/8 dès 30 min, la BMP-9 a engendré un retard d'activation à 4 h. Cette observation était concomitante avec une diminution de la β -caténine. Par contre, aucune différence n'a été observée avec la BMP-2 et la BMP-9 en termes d'activation des MAPKinases. Néanmoins, tant la BMP-2 que la BMP-9 ont été capables d'induire la différenciation des préostéoblastes MC3T3-E1 sur PCL-pRGD telle que mis en évidence par la synthèse d'ARNm codant pour Dlx5, Ostérix ou l'ostéocalcine et l'augmentation de l'activité de l'alkaline phosphatase à 72h. Mais l'utilisation d'une combinaison de la BMP-2 avec la BMP-9 stabilisant la β -caténine n'a pas permis d'obtenir un effet additif sur la différenciation, des activations semblables à celles de la BMP-2 utilisée seule ayant été alors observées.

En résumé, l'utilisation de BMP-2 ou de BMP-9 en combinaison avec une surface fonctionnalisée par des peptides d'adhésion semble être une voie prometteuse pour favoriser la différenciation cellulaire. Cependant, cette étude montre également que la BMP-2 et la BMP-9 induisent des voies d'activation antagonistes au contact du PCL-pRGD. Elle met donc l'accent sur la nécessité de mieux comprendre l'influence de la fonctionnalisation de matériaux par des peptides d'adhésion sur la réponse aux facteurs de croissance.

Mots clés : Différenciation, facteur de croissance, MC3T3-E1, peptide d'adhésion, préostéoblastes, Smads, Surface fonctionnalisées, Wnt

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de thèse, la Professeure Nathalie Fauchaux, qui m'a accueilli dans son équipe de recherche sur les systèmes biohybrides cellulés-biomatériaux à l'Université de Sherbrooke. Nos nombreux 'brainstorming' m'ont guidé et ont permis l'aboutissement de ce projet. Je remercie également les différents organismes subventionnaires dont la Chaire de Recherche du Canada, le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada et les Instituts de Recherche en Santé du Canada qui ont financé ce projet.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude à Éric Bergeron et Helena Senta pour leur aide aussi bien à l'intérieur qu'à l'extérieur de l'Université. Je ne saurais oublier les autres membres du groupe comme Alex Daviau, Marc-Antoine Lauzon, Yasaman Alinejad, Sabrina Beauvais et Hyunjin Park. Merci pour votre enthousiasme au travail, votre bonne humeur et surtout d'avoir participé à mes délires : les pirates ne passeront pas ! Je n'oublierais pas non plus l'ensemble des stagiaires qui pendant ces années ont traversé le laboratoire et ont tous apporté un petit quelque chose.

Merci également à Isabelle Arsenault, Valérie Larouche, Serge Gagnon, Stéphane Guay, Alain Lévesque, Karl St Louis et Nicolas Maheux. Je tiens aussi à remercier le Docteur Sophie Roux et le Professeur Guillaume Grenier pour nos échanges et discussions durant nos rencontres au CHUS. Je remercie également les membres du Centre de Caractérisation des Matériaux de l'Université de Sherbrooke et notamment M. Stéphane Guttierrez pour son aide lors de l'utilisation du microscope électronique à balayage, ainsi que Mme Suzie Poulin de l'Université de Montréal pour les analyses de surface.

Une petite pensée pour mes amis qui malgré les changements de dernières minutes ont toujours été compréhensifs et présents dans les moments difficiles (ça se pourrait, ça se pourrait!!!).

J'aimerais pouvoir trouver les mots pour exprimer toute ma reconnaissance à mes parents, ma sœur et ma famille : le support inconditionnel que vous m'avez prodigué durant ces années a grandement favorisé la réalisation de ce doctorat.

Je voudrais également remercier les différents membres du jury, le Professeur Denis Groleau, le Professeur Gaétan Laroche, la Professeure Sophie Lerouge, le Professeur Bernard Marcos et le Professeur Joël Sirois pour avoir pris le temps de lire et d'évaluer ce travail de doctorat.

Table des matières :

Résumé	i
Remerciements	ii
Table des matières	iii
Liste des figures	vi
Liste des tableaux	ix
Abréviations	x
1. Chapitre 1 : Introduction	1
1.1. Mise en contexte et problématique	1
1.2. Définition du projet de recherche	3
1.2.1. Développement d'un film de polycaprolactone fonctionnalisé par des peptides d'adhésion afin de favoriser la réponse des préostéoblastes à la BMP-2	4
1.2.2. Étude de la réponse des préostéoblastes à la BMP-2 et à la BMP-9 sur une surface fonctionnalisée par des peptides d'adhésion	4
1.3. Objectifs du projet de recherche	5
1.3.1. Effet du polycaprolactone fonctionnalisé sur le comportement de préostéoblastes murins	5
1.3.2. Effet de la BMP-2 et/ou de la BMP-9 sur des préostéoblastes attachés à du polycaprolactone fonctionnalisé par un peptide d'adhésion extrait de la sialoprotéine osseuse	6
1.4. Contributions originales	6
1.4.1. Effet du polycaprolactone fonctionnalisé sur le comportement de préostéoblastes murins	6
1.4.2. Effet de la BMP-2 et/ou de la BMP-9 sur des préostéoblastes attachés à du polycaprolactone fonctionnalisé par un peptide d'adhésion extrait de la sialoprotéine osseuse	7
2. Chapitre 2 : État de l'art	9
2.1. Le tissu osseux	9
2.1.1. Histologie	9
2.1.2. Les cellules osseuses	10
2.1.3. L'équilibre ostéoblastes/ostéoclastes : le remodelage osseux	15
2.2. La matrice extracellulaire	17
2.2.1. La matrice inorganique	17
2.2.2. La matrice organique	18
2.3. Les intégrines	21
2.3.1. Structure	21
2.3.2. Organisation des protéines du cytosquelette et signalisation intracellulaire	25

2.4. Régulation du comportement des cellules osseuses par les BMPs	28
2.4.1. Les sous familles de BMPs	28
2.4.2. Les voies de signalisation des BMPs	33
2.4.3. Les réactions croisées intégrines/BMPs	35
2.5. Autres voies de signalisation	36
2.5.1. La voie des MAPKs	36
2.5.2. La voie Wnt canonique	38
2.6. Choix du matériau	42
2.6.1. Les matériaux en régénération osseuse	42
2.6.2. Le polycaprolactone	44
2.6.3. Interaction du polycaprolactone avec les cellules	46
3. Chapitre 3 : Effet du polycaprolactone fonctionnalisé sur le comportement de préostéoblastes murins	52
3.1. Résumé français	53
3.2. Abstract	54
3.3. Introduction	54
3.4. Materials and methods	56
3.4.1. Materials	56
3.4.2. Preparation of PCL films	56
3.4.3. Characterization of PCL films	57
3.4.4. Adsorption of serum proteins onto PCL films	57
3.4.5. Cell experiments	58
3.4.6. Statistical analysis	60
3.5. Results and discussion	60
3.5.1. Characterization of PCL surface modification	60
3.5.2. Non-specific adsorption of serum proteins onto PCL	64
3.5.3. Cytoskeleton organization in 10 % FBS	66
3.5.4. Cytoskeleton organization and FAK activation in serum-free medium	68
3.5.5. Smad pathway activation induced by rhBMP-2 in serum-free medium	70
3.6. Conclusion	71
4. Chapitre 4 : Effet de la BMP-2 et/ou de la BMP-9 sur des préostéoblastes attachés à du polycaprolactone fonctionnalisé par un peptide d'adhésion extrait de la sialoprotéine osseuse	73
4.1. Résumé français	74
4.2. Abstract	75
4.3. Introduction	75
4.4. Materials and methods	77
4.4.1. Materials	77
4.4.2. Methods	78
4.5. Results	82
4.5.1. Cell survival on functionalized PCL films	82
4.5.2. Dose response effect of BMP-2 and BMP-9 on Osx transcripts	84
4.5.3. Kinetics of the BMP signaling pathway activation in MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD by BMP-2 and/or BMP-9	85

4.5.4. Beta-catenin in MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD and treated by BMP-2 and/or BMP-9	89
4.5.5. Differentiation of MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD in the presence of BMP-2 and/or BMP-9	90
4.6. Discussion	93
4.7. Conclusion	97
4.8. Acknowledgements	97
5. Chapitre 5: Discussion générale	98
5.1. Influence des peptides d'adhésion sur le comportement de préostéoblastes MC3T3-E1	99
5.1.1. Méthodologie utilisée pour la fonctionnalisation des films de PCL et caractérisation de leurs propriétés de surface	99
5.1.2. Différence d'organisation des protéines du cytosquelette dans les préostéoblastes en fonction des peptides utilisés	102
5.1.3. La présence de peptides d'adhésion est nécessaire à la réponse des préostéoblastes murins à la BMP-2	103
5.2. Comment mimer le vivant afin d'obtenir une meilleure différenciation osseuse	104
5.2.1. La stimulation des préostéoblastes adhérant au PCL-pRGD par la BMP-2 et la BMP-9 induit des cinétiques de phosphorylation des Smads et de stabilisation de la β -caténine différentes	104
5.2.2. La stimulation des préostéoblastes adhérant au PCL-pRGD par l'addition simultanée des BMP-2 et BMP-9 induit une différenciation cellulaire comparable à celle de la BMP-2 seule	107
6. Chapitre 6 : Conclusion et perspectives	110
6.1. Conclusion	110
6.2. Perspectives	111
6.2.1. Favoriser l'interaction cellule/PCL-pRGD	111
6.2.2. Favoriser les interactions intégrines/BMP	112
6.2.3. Comprendre les interactions Wnt/BMP	113
6.2.4. Stimulation séquentielle des cellules adhérentes au PCL-pRGD par la BMP-2 et la BMP-9	114
Références	116

LISTE DES FIGURES :

Figure 2.1	Organisation du tissu osseux	10
Figure 2.2	Différenciation des CSMs en adipocytes, chondrocytes ou ostéoblastes	11
Figure 2.3	Différenciation des cellules souches hématopoïétiques en ostéoclaste	13
Figure 2.4	Structure d'un ostéoclaste adhérant à une lamelle osseuse	14
Figure 2.5	Le remodelage osseux : l'importance de la BMU	16
Figure 2.6	Organisations d'une intégrine constituée de deux sous-unités α et β sous formes active et inactive	22
Figure 2.7	Schéma simplifié de l'organisation d'un point focal et activation de la FAK	25
Figure 2.8	Prolifération et différenciation des préostéoblastes issus des CSMs	28
Figure 2.9	Processus de réparation osseuse après fracture	31
Figure 2.10	La voie canonique des Smads	34
Figure 2.11	Voie de signalisation des MAPKinases	37
Figure 2.12	Influence des Wnts sur la différenciation des CSMs	38
Figure 2.13	Voie canonique et non canonique induite par la stimulation de Wnts	39
Figure 2.14	Réaction croisée BMPs/voie canonique des Wnts	40
Figure 2.15	Structure du PCL	44
Figure 2.16	Schéma de la fonctionnalisation par hydrolyse ou aminolyse d'un film de PCL	47
Figure 3.1	(A) Scanning electron microscope images of PCL films. (B) Atomic force microscope images of PCL films in air	62
Figure 3.2	(A) SDS-PAGE under reducing conditions of proteins desorbed from Hydro PCL, pRGD and pRGE. (B) The protein 68 kDa band separated by SDS-PAGE was quantified by densitometric analysis	65
Figure 3.3	Western blot analysis of (A) fibronectin and (B) vitronectin of desorbed proteins from Hydro PCL, pRGD and pRGE	66
Figure 3.4	(A) MC3T3-E1 cells were incubated with PCL films for 1 h in medium containing 10 % FBS. The attached cells were stained with monoclonal antibodies to vinculin and phalloidin-rhodamine to label filamentous actin (F-actin). (B) Areas of MC3T3-E1 spreading on PCL films	67
Figure 3.5	(A) MC3T3-E1 cells incubated with PCL films for 1 h in serum-free medium. The cells attached to Hydro PCL, pRGD and pRGE were stained with monoclonal antibodies to vinculin and phalloidin-rhodamine	

	to label F-actin. (B) Areas of MC3T3-E1 spreading on PCL films after incubation for 1 h in serum-free medium	68
Figure 3.6	(A) Fluorescent microscopy images showing immunolabelling for phosphorylated FAK (pFAK) on Y397 in lysates of MC3T3-E1 cells attached to Hydro PCL, pRGD and pRGE films by incubation for 1 h in serum-free medium. (B) Western blot of pFAK on Y397 in lysates of MC3T3-E1 cells attached to Hydro PCL, pRGD and pRGE films by incubation for 1 h in serum-free medium	70
Figure 3.7	Western blot analysis of phosphorylated Smad 1/5/8, total Smad 1/5/8 in lysates of MC3T3-E1 cells attached to pRGD and pRGE PCL films by incubation for 1 h in serum-free medium with or without rhBMP-2 (100 ng/mL)	71
Figure 4.1	(A) MC3T3-E1 preosteoblasts were seeded onto PCL-pRGD or PCL-pRGE films and incubated for 4 h or 72 h in FBS-free medium. The attached cells were stained with rhodamine-phalloidin to label filamentous actin and with DAPI to stain DNA. (B) MC3T3-E1 preosteoblasts seeded onto PCL-pRGD films and incubated for 4 to 72 h without serum. The attached cells were stained with TUNEL assay to label damaged DNA and with DAPI to label DNA	83
Figure 4.2	Effect of incubation for 24 h with concentrations from 0.19 to 3.8 nM of (A) BMP-2 and (B) BMP-9 on MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD	84
Figure 4.3	(A) Western blot analysis and (B) densitometric analysis of the kinetics of Smad1/5/8 phosphorylation and total Smad1/5/8 in lysates of MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD for 1 h and then stimulated with 0.38 nM BMP-2 and/or BMP-9 for 0, 0.5, 1, 2 and 4 h. (C) Western blot analysis of the phosphorylated Smad2 and total Smad2 in lysates extracted from MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD for 1 h and then stimulated with 0.38 nM BMP-2 and/or BMP-9 for 0, 1, 2, 4 and 6 h (D) MC3T3-E1 preosteoblasts seeded onto PCL-pRGD films were incubated for 4 h without serum. The attached cells were incubated with rabbit antibodies against pSmad1/5/8 and with DAPI to label DNA	86
Figure 4.4	(A) Western blot analysis and (B) densitometric analysis of phosphorylated JNK, p38, ERK1/2 and total p38, ERK1/2 and β -actin in lysates of MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD for 1h and then stimulated with BMP-2 and/or BMP-9 (0.38nM) for 0, 0.5, 1, 2 and 4 h	89
Figure 4.5	(A) Western blot analysis and (B) densitometric analysis of the β -catenin and β -actin in lysates of MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD for 1 h and stimulated with BMP-2 and/or BMP-9 (0.38nM) for 0, 1, 2, 4 and 6 h	90
Figure 4.6	Differentiation of MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD for 1 h without serum and then stimulated with BMP-2 and/or BMP-9	

	(0.38 nM). The mRNAs encoding (A) Dlx5 (4 h), (B) Osx (24 h) and (C) osteocalcin (72 h) were quantified by qPCR and normalized to the mRNAs in untreated cells (CTL)	92
Figure 4.7	Differentiation of MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD for 1 h without serum and then stimulated with BMP-2 and/or BMP-9 (0.38 nM) for 72 h	93
Figure 5.1	Sims-ToF d'une surface de PCL-pRGD	100
Figure 5.2	Effet des peptides pRGD et pRGE sur la capacité des préostéoblastes murins à organiser les protéines du cytosquelette et à activer la FAK	103
Figure 5.3	Signalisation intracellulaire induite par la BMP-2 et la BMP-9 dans les préostéoblastes murins adhérant aux films de PCL-pRGD	107
Figure 6.1	Cinétique de signalisation de la β -caténine en présence d'une stimulation par Wnt3a 3h après une stimulation par la BMP-9	113
Figure 6.2	Expression de l'ARNm codant pour Dlx5 par rapport au CTL 6h après la stimulation par la BMP-9	114

LISTE DES TABLEAUX :

Tableau 2.1	Composition de la matrice osseuse bovine	17
Tableau 2.2	Protéines non collagéniques constitutives de la matrice organique	20
Tableau 2.3	Intégrines : leurs ligands et leurs fonctions	24
Tableau 2.4	Familles des BMPs et leurs récepteurs	29
Tableau 2.5	Effets des BMPs sur les cellules osseuses	32
Tableau 2.6	Les matériaux en application osseuse, avantages et limitations	42
Tableau 2.7	Propriétés de différents polymères synthétiques	43
Tableau 2.8	Utilisation commerciale du PCL	45
Tableau 2.9	PCL en application osseuse	46
Tableau 2.10	Fonctionnalisation du PCL par des peptides RGD	49
Tableau 3.1	Average surface roughness and static water contact angle measurements of PCL films	63
Tableau 3.2	XPS analysis of the PCL films	64
Tableau 4.1	Positive cell counting from TUNEL assay	84

ABRÉVIATIONS :

1,25-(OH) ₂ D ₃	Vitamine 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3
2T3	Lignée cellulaire ostéoblastique
Actine-F/F-actin	Filament d'actine
Actine-G	Actine globulaire
ActR	Récepteur de l'activine
ADMIDAS	Adjacent à MIDAS
ADN/DNA	Acide désoxyribonucléique, <i>deoxyribonucleic acid</i>
ADNc/cDNA	ADN complémentaire, <i>complementary DNA</i>
AdBMP-9	BMP-9 synthétisé par l'utilisation d'adénovirus, <i>BMP-9 from adenovirus</i>
AFM	Microscopie à force atomique, <i>atomic force microscopy</i>
ALK	Récepteur activine, <i>Activin receptor-like kinase</i>
ALP	Phosphatase alcaline
ARN/RNA	Acide ribonucléique, <i>ribonucleic acid</i>
ARNm/mRNA	ARN messenger, <i>messenger RNA</i>
APC	Adenomatous polyposis coli
ASAP1	<i>Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain containing protein 1</i>
ATP	Adénosine tri-phosphate
BMP	Protéine morphogénétique osseuse
BMPR	Récepteur de la BMP
BMU	Unité multicellulaire de base
BSA	Albumine de sérum bovin, <i>bovine serum albumin</i>
BSP	Sialoprotéine osseuse, <i>bone sialoprotein</i>
C2C12	Myoblaste murin
C3H10T1/2	Cellule souche murine
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
Cellule D1	Cellule souche murine
CIHR	<i>Canadian Institute of Health and Research</i>
CK1 α	Caséine kinase 1 α
Co-Smad	Smad partenaire commun, <i>common-partner Smad</i>
CREB	<i>Cyclic AMP response element binding protein</i>
CSM	Cellule stromale mésenchymateuse
CTL	Contrôle (cellules non traitées), <i>untreated cells</i>
DAPI	4-6-diamidino-2-phenylindole
Dkk	Dickkopf
Dlx5	Distal-less homeobox 5
Dvl	Dishevelled
EC ₅₀	Concentration efficace médiane
ECM	Matrice extracellulaire, <i>extracellular matrix</i>
EDC	1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide hydrochloride
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FBS	Foetal bovine serum
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes
FNIII ₇₋₁₀	Fragment de la fibronectine

GAG	Glycosaminoglycanes
GDF	<i>Growth differentiation factor</i>
Gla	acides γ -carboxyglutamique
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GS3K- β	Glycogen synthase kinase 3 β
HAP	Hydroxyapatite
HIF1 α	<i>Hypoxia-inducible factor 1 α</i>
Hydro PCL	Film de PCL hydrolysé
IL	Interleukine
I-Smad	Inhibiteur de Smad
JNK	cJun N-terminal kinase
K562	Cellules issues d'une leucémie myéloïde chronique
L929	Fibroblaste murin
Lef1	<i>Lymphoid enhancer-binding factor 1</i>
LRP5/6	<i>Low density lipoprotein receptor related protein 5 and 6</i>
Mac-1+ c-fms+	Précurseur ostéoclastique
MAPKinase	Protéine kinase activée par des agents mitogènes, <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
M-CSF	<i>Macrophage-colony stimulating factor</i>
MC3T3-E1	Préostéoblaste murin
MEM	<i>Minimum essential medium</i>
MIDAS	<i>Metal ion-dependent adhesion site</i>
MKK	MAPKinase kinase
MMP	Métalloprotéinase matricielle
MSX2	Msh homeobox 2
NF-AT	<i>Nuclear factor of activated T</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa B</i>
NHS	N-hydroxysuccinimide
NIH-3T3	Fibroblaste murin
NSERC	<i>National Science and Engineering Research Council of Canada</i>
OC	Ostéocalcine
OPG	Ostéoprotégérine
Osx	Ostérix
pBMP	peptide dérivé des BMPs
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCL	Polycaprolactone
PCL-pRGD	PCL fonctionnalisé par le pRGD
PDEA	2-(2-pyridinyldithio) ethaneamine hydrochloride
PEG	Polyéthylène glycol
PLA	Poly lactide
PLGA	Poly lactide-co-glycolide
PLL	Poly(L-lysine)
PMMA	Polyméthacrylate de méthyle
PIPK1 γ	Phosphatidylinositol(4) phosphate 5 kinase type 1 γ
PPAR γ 2	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor γ 2</i>
PTH	Parathormone
PS	Polystyrène
qPCR	Amplification en chaîne par polymérase quantitative en temps réel, <i>quantitative polymerase chain reaction</i>
Ra	Rugosité moyenne arithmétique

RMS/Rq	Rugosité moyenne quadratique, <i>root mean square</i>
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa beta ligand</i>
RGD	Tripeptide Arginine-Glycine-Acide aspartique
rhBMP	<i>Recombinant human BMP</i>
RhoA	<i>Ras homolog family member A</i>
ROCK2	<i>Rho kinase 2</i>
R-Smad	Smad régulé par les récepteurs, <i>receptor-regulated Smad</i>
Runx2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
SD	Écart type, <i>standard deviation</i>
SEM	Microscopie électronique à balayage, <i>Scanning electron microscopy</i>
Sims-ToF	Spectrométrie de masse d'ions secondaires à temps de vol
siRNA	Petit ARN interférent, <i>small interfering RNA</i>
Smad	<i>Small mothers against decapentaplegic</i>
Smurf	<i>Smad ubiquitin regulatory factor</i>
Sox9	<i>Sex determining region Y-box 9</i>
S1PR1	Récepteur de sphingosine-1 phosphate
SFRP	<i>Secreted frizzled-related proteins</i>
SP-1	Sphingosine-1 phosphate
sulfo-SMCC	sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate
SyMBS	<i>Synergistic metal ion binding site</i>
TAB1	<i>TAK binding protein 1</i>
TAK1	<i>TGF-β activated kinase 1</i>
Tcf	T-cell factor
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TRAF6	<i>TNF receptor-associated factor 6</i>
TdT	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase</i>
TUNEL	<i>TdT dUTP nick end labeling</i>
UV/Vis	UV/Visible
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
XIAP	Inhibiteur de l'apoptose lié au chromosome X
XPS	Spectrométrie photoélectronique X, <i>X-ray photoelectron spectroscopy</i>

1. CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1. Mise en contexte et problématique

Les progrès médicaux ont permis d'augmenter l'espérance de vie au Canada de 77 à 81 ans entre 1990 et 2009 (Organisation Mondiale de la Santé, Statistique sanitaire mondiale 2012). Cette population vieillissante se trouve néanmoins confrontée à des troubles musculo-squelettiques. Au Canada, toutes provinces confondues, 19,2 % des femmes et 3,4 % des hommes en 2009 étaient touchés par l'ostéoporose. Ainsi, 8 % des canadiens âgés de plus de 40 ans ont déjà subi une fracture des hanches, du poignet ou de la colonne vertébrale en raison de complications liées à l'ostéoporose (Agence de la santé publique du Canada, 2009). De plus, aux États-Unis seulement, 5,6 millions de fractures sont dénombrées par année et 5 à 10 % d'entre elles engendrent des problèmes de réparation osseuse et affectent le temps de guérison et la qualité de vie des patients. De plus, en 2008, le marché des substituts osseux atteignait à lui seul 1,6 milliards de dollars US (Li et Wozney, 2001; Mendenhall Associates, 2008).

Afin de combler les pertes osseuses engendrées par ces pathologies (fractures ostéoporotiques, infection, etc.), et qui sont incapables « de s'auto-réparer », des greffes osseuses sont couramment utilisées (Urabe *et al.*, 2007). Néanmoins, le nombre de greffes osseuses pratiquées dans les pays industrialisés ne cesse de croître ces dernières années (Urabe *et al.*, 2007). Une collecte de données au Japon couvrant la période de 2000 à 2004 montre que 82,4 % des transplantations se font dans le tissu osseux (Urabe *et al.*, 2007). De même, environ 500 000 greffes osseuses ou substituts sont implantés chaque année aux États-Unis dont 50 % dans le cadre de fusions lombaires (Ludvig *et al.*, 2000). Afin de combler les pertes osseuses, plusieurs possibilités s'offrent au chirurgien orthopédique, dont le « standard en or » pour cette profession: l'autogreffe. L'autogreffe présente plusieurs avantages puisque le tissu prélevé est celui du patient le risque de rejet immunitaire est donc éliminé. Le tissu de la crête iliaque est souvent utilisé pour extraire le greffon car sa structure favorise une bonne colonisation par les cellules osseuses au niveau du site receveur ainsi qu'une bonne prolifération et différenciation cellulaires (Bruno *et al.*, 2001; Conway, 2010). Néanmoins, la taille limitée du greffon et la nécessité d'une seconde chirurgie qui augmente les risques de saignement et d'infection pour le patient restent problématiques (Arrington *et al.*, 1996). De plus, l'autogreffe provoque une morbidité tissulaire au niveau du site du prélèvement qui engendre de la douleur (Arrington *et al.*, 1996; Pollock *et al.*, 2008).

Une stratégie alternative dans le domaine des greffes osseuses consiste aussi à prélever le greffon chez un autre individu de la même espèce (allogreffe de cadavre) ou d'une espèce différente (xéno greffe). La xéno greffe est cependant peu utilisée et représente 0,02 % des greffons (Urabe *et al.*, 2007; Long *et al.*, 2012). L'allogreffe accroît également le risque de rejet dû aux réponses immunitaires induites par la reconnaissance du non-soi. D'autre part, le risque de transmission de maladies, même si ce dernier demeure faible, est toujours présent dans le cadre de l'utilisation de l'allogreffe (1 cas sur 1,6 million pour le virus VIH) (Graham *et al.*, 2010). Finalement, les propriétés mécaniques du greffon (autogreffe, allogreffe et xéno greffe) peuvent différer entre le site de prélèvement et le site receveur de la greffe (Giannoudis *et al.*, 2005).

Des études cliniques ont montré que des éponges de collagène de type I, couplées à des protéines morphogénétiques osseuses (BMPs), facteurs de croissance impliqués dans le processus physiologique de réparation des fractures osseuses, pouvaient induire des résultats similaires à ceux des autogreffes (Burkus *et al.*, 2002 et 2004). De plus, l'implantation de tels systèmes réduit le temps de résidence en milieu hospitalier (Burkus *et al.*, 2004). Actuellement, la « Food and Drug Administration » (FDA) a autorisé l'utilisation de la BMP-2 et de la BMP-7 en clinique. La compagnie Medtronic commercialise une éponge de collagène contenant de la BMP-2 (InFUSE™) pour des applications au niveau de la colonne vertébrale et des fractures du tibia en combinaison avec des cages de titane (Medtronic). La compagnie Stryker Biotech, quant à elle, a développé une matrice de collagène renfermant la BMP-7 pour des implantations au niveau de la colonne vertébrale (OP-1™). De tels systèmes démontrent que des solutions alternatives peuvent être élaborées afin de pallier les problèmes inhérents aux greffes osseuses. Ainsi, le comblement des pertes osseuses peut être assuré par des biomatériaux de substitution qui peuvent être inorganiques, polymériques ou composites.

Afin de remplacer l'autogreffe, on assiste ainsi depuis quelques années au développement de nouveaux matériaux dits biomimétiques. Le but de ces matériaux est en fait de mimer le vivant afin de permettre leur intégration dans le tissu osseux (ostéointégration), leur colonisation par les cellules osseuses (ostéoconduction), ainsi que la possibilité d'induire la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en ostéoblastes matures (ostéoinduction). Les matériaux peuvent, par exemple, présenter à leur surface des peptides comme le Arginine-Glycine-Acide aspartique (RGD) ou des protéines issus de la matrice extracellulaire (ECM) osseuse pour favoriser les interactions cellules-matériau *via* des récepteurs cellulaires spécifiques appelés intégrines.

Le matériau peut également être biodégradable afin d'être remplacé par le tissu osseux néosynthétisé (Wu *et al.*, 2011). Ces matériaux sont souvent combinés à une stratégie d'ingénierie tissulaire afin de permettre *ex vivo* une meilleure ostéoconduction et ostéoinduction (Ratner *et al.*, 2004). Cependant, même si de plus en plus d'études montrent l'effet de la fonctionnalisation de matériaux par des peptides d'adhésion sur l'attachement, la survie et la différenciation cellulaires (Marletta *et al.*, 2005; Karakecili *et al.*, 2007; Zhang et Hollister, 2009), peu d'études s'intéressent pour le moment à l'utilisation de matériaux fonctionnalisés par des peptides d'adhésion en combinaison avec les BMPs (Marquis *et al.*, 2008; He *et al.*, 2008).

1.2. Définition du projet de recherche

L'hypothèse principale de recherche du projet proposé est la suivante : des peptides d'adhésion greffés sur une surface de polycaprolactone (PCL) peuvent influencer le comportement de préostéoblastes murins, plus particulièrement leur capacité à adhérer, à s'étaler et ainsi répondre aux BMPs afin de se différencier en ostéoblastes. L'utilisation de cellules murines MC3T3-E1 (clone 14) est communément admise comme un modèle *in vitro* représentatif de la différenciation des ostéoblastes humains. En effet, lorsque stimulés par des facteurs de croissance (BMPs) ou de l'acide ascorbique, les préostéoblastes murins MC3T3-E1 expriment les mêmes marqueurs de différenciation, tels le *runx-related transcription factor 2* (Runx2) ou la phosphatase alcaline (ALP), que les ostéoblastes humains (Chien *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2002). Le peptide d'adhésion sélectionné dans le cadre de cette étude est dérivé de la sialoprotéine osseuse (BSP) et est dénommé pRGD (Ac-CGGNGEPRGDTYRAY-NH₂). Ce peptide interagit avec les cellules par l'intermédiaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Rezania et Healy, 1999b; Marquis *et al.*, 2009). Afin de mettre en évidence son influence, un peptide négatif pRGE est également utilisé. Plusieurs objectifs et défis émergent alors de ce projet au niveau : i) du choix du matériau, ii) du choix de la fonctionnalisation de la surface iii) de l'impact de cette fonctionnalisation sur la réponse de préostéoblastes aux facteurs de croissance.

1.2.1. Développement d'un film de polycaprolactone fonctionnalisé par des peptides d'adhésion afin de favoriser la réponse des préostéoblastes à la BMP-2

L'utilisation de peptides d'adhésion comportant la séquence RGD, présente dans la plupart des protéines de l'ECM, pour fonctionnaliser des polymères synthétiques permet une meilleure adhésion cellulaire (Marletta *et al.*, 2005). Cette dernière est primordiale pour la survie à plus long terme des cellules et leur fonctionnement (Frisch *et al.*, 1996). Notre stratégie de recherche consiste donc à considérer l'interaction cellules-biomatériau comme un premier message, le matériau n'étant plus inerte mais capable de réguler le comportement subséquent des cellules et leurs réponses à leur environnement dont la BMP-2, facteur de croissance couramment utilisé en clinique afin d'accroître la réparation tissulaire osseuse.

L'hypothèse de recherche de cette première partie du projet de doctorat est que *la fonctionnalisation d'un film de PCL par le pRGD (PCL-pRGD) favorise non seulement l'attachement et l'étalement de préostéoblastes mais est également nécessaire à leur activation par la BMP-2.*

1.2.2. Étude de la réponse des préostéoblastes à la BMP-2 et à la BMP-9 sur une surface fonctionnalisée par des peptides d'adhésion

La BMP-9 a démontré une activité ostéogénique plus importante que celle de la BMP-2, molécule actuellement utilisée en clinique (Cheng *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2004 et 2009). Ainsi, l'utilisation de la BMP-9 pour favoriser la différenciation et le fonctionnement des cellules formant l'os semble être prometteuse. De plus, dans les diverses étapes (réaction inflammatoire, hématome, formation de cartilage, formation osseuse) de la réparation endochondrale des fractures osseuses *in vivo*, différents BMPs et facteurs de croissance et cytokines (BMP-2,-3,-4,-7,-8, VEGF (*vascular endothelial growth factor*), TNF α (*tumor necrosis factor α*), IL-1 (interleukine-1), IL-6, RANKL (*receptor activator of nuclear factor kappa beta ligand*), M-CSF (*macrophage-colony stimulating factor*)) sont impliqués (Al-Aql *et al.*, 2008). Il semble donc pertinent, après avoir synthétisé une surface fonctionnalisée par des peptides d'adhésion, d'utiliser une

combinaison de BMPs afin de mimer le phénomène de la réparation osseuse et d'investiguer plus avant l'effet de la BMP-9.

L'hypothèse de recherche de cette seconde partie du projet de doctorat est donc que *les films de PCL fonctionnalisés par des peptides pRGD ou pRGE influencent la survie, la signalisation intracellulaire et la différenciation des préostéoblastes en présence de BMP-2 et BMP-9 utilisées seules ou en combinaison.*

1.3. Objectifs du projet de recherche

1.3.1. Effet du polycaprolactone fonctionnalisé sur le comportement de préostéoblastes murins

Trois sous-objectifs ont été définis afin de vérifier l'hypothèse de recherche « *la fonctionnalisation d'un film de polycaprolactone par un peptide RGD extrait de la BSP (pRGD) favorise non seulement l'attachement et l'étalement de préostéoblastes mais est également nécessaire à leur activation par la BMP-2* »:

- 1) Réaliser la fonctionnalisation des films de PCL par des peptides pRGD ou leur contrôle négatif pRGE et caractériser leur surface à chacune des étapes de fonctionnalisation en termes d'épaisseur, de topographie (rugosité) et de modifications chimiques de surface.
- 2) Déterminer la capacité des films de PCL avec ou sans fonctionnalisation pRGD ou pRGE à adsorber de manière non spécifique les protéines sériques, notamment les protéines adhésives fibronectine et vitronectine et leur effet sur l'attachement et l'étalement cellulaire.
- 3) Déterminer l'impact de la fonctionnalisation des films de PCL pRGD en absence de sérum sur le comportement cellulaire en termes d'attachement (organisation des protéines du cytosquelette), étalement et signalisation intégrines et BMPs.

1.3.2. Effet de la BMP-2 et/ou de la BMP-9 sur des préostéoblastes attachés à du polycaprolactone fonctionnalisé par un peptide d'adhésion extrait de la sialoprotéine osseuse

Quatre sous-objectifs ont été définis afin de vérifier l'hypothèse de recherche « *les films de PCL fonctionnalisés par des peptides pRGD ou pRGE influencent la survie, la signalisation intracellulaire et la différenciation des préostéoblastes en présence de BMP-2 et BMP-9 utilisées seules ou en combinaison* » :

- 1) Étudier l'adhésion et la survie des préostéoblastes ensemencés sur des films de PCL-pRGD et PCL-pRGE après plusieurs jours d'incubation.
- 2) Déterminer la concentration de la BMP-2 et/ou de la BMP-9 à utiliser sur les préostéoblastes adhérant aux films PCL-pRGD.
- 3) Déterminer les cinétiques d'activation des voies de signalisation MAP Kinases, Smads (*small mothers against decapentaplegic*) et Wnts canonique dans les préostéoblastes adhérant aux films de PCL-pRGD et stimulés par la BMP-2 et/ou la BMP-9.
- 4) Mettre en évidence la différenciation des préostéoblastes adhérant aux films de PCL-pRGD et stimulés par la BMP-2 et/ou la BMP-9 en analysant l'activation des gènes codant pour des marqueurs ostéogéniques et en mesurant l'activité de l'ALP.

1.4. Contributions originales

Les résultats originaux obtenus au cours de cette thèse de doctorat ont ainsi permis la publication de deux articles scientifiques (Chapitre 3 et Chapitre 4) dans la revue *Biomaterials*.

1.4.1. Effet du polycaprolactone fonctionnalisé sur le comportement de préostéoblastes murins

Le chapitre 3 a ainsi démontré la capacité du PCL-pRGD à permettre l'attachement et l'étalement de préostéoblastes murins et la capacité des cellules à répondre à la BMP-2 par rapport au PCL-pRGE.

- La fonctionnalisation par le pRGD et son contrôle négatif pRGE entraîne une modification chimique engendrant une augmentation du caractère hydrophile de la surface. Les films de PCL, PCL-pRGD et PCL-pRGE adsorbent de façon non spécifique les protéines du sérum.
- Le PCL-pRGD permet un meilleur étalement et organisation des protéines du cytosquelette des préostéoblastes adhérant par rapport au PCL-pRGE dans un milieu sans sérum.
- L'activation de la FAK (*focal adhesion kinase*) mesurée par son autophosphorylation sur la Tyr³⁹⁷ est également plus importante pour les préostéoblastes adhérant au PCL-pRGD par rapport au PCL-pRGE ou PCL non fonctionnalisé.
- Seuls les préostéoblastes adhérents au PCL-pRGD peuvent répondre à la stimulation par la BMP-2 *via* une augmentation de la phosphorylation des Smad1/5/8.

1.4.2. Effet de la BMP-2 et/ou de la BMP-9 sur des préostéoblastes attachés à du polycaprolactone fonctionnalisé par un peptide d'adhésion extrait de la sialoprotéine osseuse

Le chapitre 4 met en évidence la différence de signalisation et de différenciation des préostéoblastes adhérents au PCL-pRGD et stimulés par la BMP-2 et/ou la BMP-9.

- La détermination de la concentration efficace médiane (EC₅₀) de la BMP-2 et de la BMP-9 sur les préostéoblastes MC3T3-E1 montre une valeur plus faible pour la BMP-2 par rapport à la BMP-9 (0,81 *vs* 1,18 nM).
- A une concentration équimolaire (0,38 nM), la BMP-2 et/ou BMP-9 induisent des cinétiques d'activation des différentes voies des MAPKinases (protéine kinase activée par des agents mitogènes) (p38, ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases 1/2*) et JNK (*cJun N-terminal kinase*)) similaires.
- L'addition dans le milieu de culture de la BMP-9 active la voie canonique des Smad1/5/8 dans les préostéoblastes adhérant au PCL-pRGD plus tardivement que ne le fait la BMP-2.
- Le délai d'activation de la voie canonique des Smad1/5/8 en présence de la BMP-9 est concomitant avec une diminution de la β -caténine.

- L'utilisation de la BMP-2 ou de la BMP-9 permet la différenciation des préostéoblastes en ostéoblastes par l'expression d'ARNm (acide ribonucléique messager) codant pour les gènes *distal-less homeobox 5* (Dlx5), ostérix (Osx) et OC ainsi que par une augmentation de l'activité de l'ALP.
- L'addition dans le milieu de culture d'un mélange équimolaire de BMP-2 et BMP-9 induit une synthèse d'ARNm codant pour Osx non significativement différente de celle induite par la BMP-2 seule.

La thèse comporte 6 chapitres. Le chapitre 1 présente un bref état de l'art sur les problèmes squelettiques et le comblement des pertes osseuses ainsi que les hypothèses, principaux objectifs et contributions de cette étude. Celle-ci vise à démontrer l'intérêt d'utiliser des matériaux biomimétiques conjointement avec des BMPs afin de favoriser le fonctionnement des cellules formant l'os. Le chapitre 2 met quant à lui en lumière les phénomènes observés au niveau du tissu osseux nécessaires à la compréhension des travaux présentés dans les chapitres 3 et 4 et plus particulièrement le rôle et la fonction de ses principaux constituants (cellules, organisation de l'ECM, BMPs et signalisation cellulaire). Cette revue de la littérature met également en évidence les nombreux défis à relever dans le domaine des matériaux biomimétiques. Le chapitre 3 présente le travail publié dans la revue *Biomaterials* en 2010 sur la synthèse et la caractérisation de films de PCL fonctionnalisés soit par le peptide d'adhésion extrait de la sialoprotéine osseuse pRGD soit par son contrôle négatif pRGE. Cet article montre également le comportement des préostéoblastes avec ou sans sérum au contact de ce matériau. Le chapitre 4 présente le travail publié dans la revue *Biomaterials* en 2013, il met en évidence la différence de signalisation observée dans les préostéoblastes MC3T3-E1 adhérents au PCL-pRGD en présence de BMP-2 et/ou BMP-9 à court terme et étudie leur différenciation à plus long terme. Le chapitre 5 permettra de discuter des résultats obtenus dans les deux articles sur la fonctionnalisation de films de PCL par des peptides et leur effet sur la réponse de préostéoblastes aux BMPs alors que le chapitre 6 présentera les conclusions et les perspectives de ce travail de doctorat.

2. CHAPITRE 2 : ETAT DE L'ART

Afin de comprendre ce projet de doctorat qui consiste à développer un matériau biomimétique capable de favoriser l'attachement et la différenciation de préostéoblastes murins en ostéoblastes sous l'effet des BMPs, il est indispensable de mieux connaître tout d'abord le tissu osseux et ses composants (cellules osseuses, ECM). Il est alors important de décrire la structure et le rôle des intégrines, qui sont les premiers éléments cellulaires impliqués dans l'interaction avec le matériau par l'intermédiaire des protéines ou des peptides d'adhésion adsorbés ou greffés à sa surface. Il est également important de comprendre le rôle des facteurs de croissance comme les BMPs au niveau de la physiologie de l'os. Finalement, le choix du matériau PCL utilisé pour faire la fonctionnalisation et créer un matériau biomimétique est présenté.

2.1. Le tissu osseux

Le squelette possède différentes fonctions. Il protège non seulement les organes tels les poumons, mais il agit également en combinaison avec les muscles du système locomoteur du corps pour permettre le déplacement. Il représente aussi un grand réservoir de minéraux et contient une quantité importante de cellules non différenciées en son sein (cellules souches hématopoïétiques, cellules stromales mésenchymateuses (CSM)).

2.1.1. Histologie

Plusieurs architectures existent au niveau de l'os, l'une compacte et dense et l'autre spongieuse (Figure 2.1). L'architecture compacte qui caractérise l'os cortical a une porosité faible, de l'ordre de 5 à 30 %. L'architecture appelée spongieuse caractérise l'os trabéculaire et possède une plus grande porosité, de 30 à 90 % (Clarke, 2008). L'os cortical est richement vascularisé afin de favoriser un apport en nutriments et oxygène important (Cariou et Bey, 2000). En effet, l'os compact s'organise en structures concentriques, appelées ostéons, qui possèdent en leur centre le canal de Havers renfermant les vaisseaux et les nerfs. L'os trabéculaire, quant à lui, est localisé notamment dans les os plats ainsi que dans les extrémités des os longs et renferme la moelle osseuse. Ces architectures compacte et spongieuse possèdent d'autre part des propriétés mécaniques différentes. Par exemple, l'os trabéculaire possède un module de Young proche de 10,4 GPa alors que celui de l'os cortical est de 18,6 GPa (Rho *et al.*, 1993).

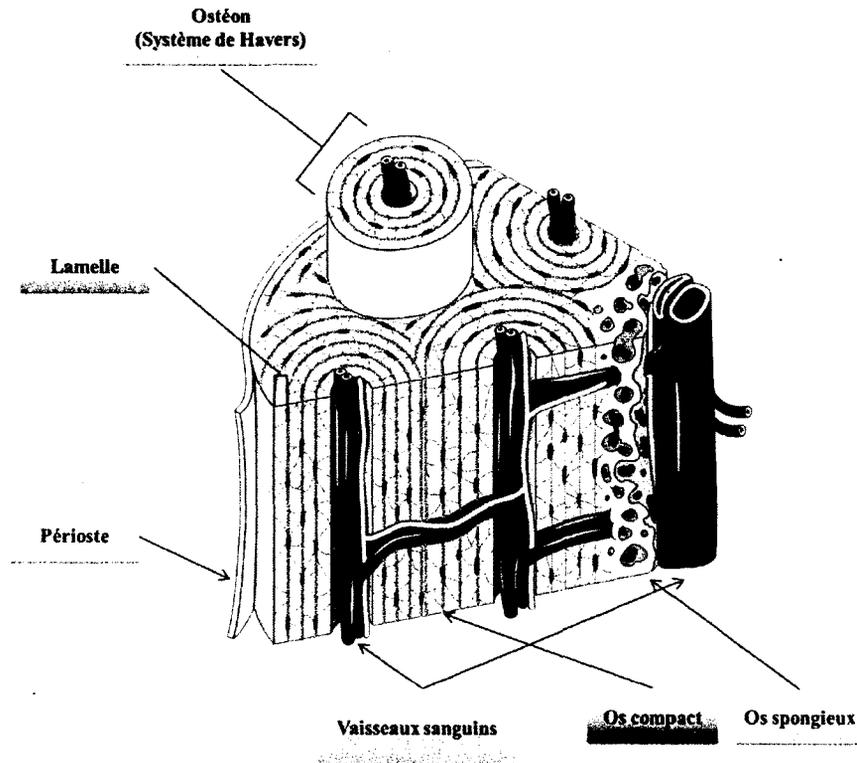


Figure 2.1 : Organisation du tissu osseux (Servier Medical Art; Clarke, 2008)

Pour répondre entre autres aux sollicitations mécaniques qui peuvent varier en fonction de l'âge, des sports pratiqués, l'os est un tissu en constant renouvellement. Cependant, avant de décrire les mécanismes impliqués dans ce remodelage osseux, il est important de mieux en connaître les acteurs, non seulement les cellules qui le composent et leur régulation (facteurs de croissance, hormones et vitamines), mais également l'ECM et sa composition qui confèrent à l'os sa résistance mécanique.

2.1.2. Les cellules osseuses

L'os est constitué de trois types de cellules osseuses, les cellules constitutives de l'os responsables de la synthèse et du maintien de la matrice osseuse (les ostéoblastes et les ostéocytes) ainsi que les cellules responsables de la dégradation de cette matrice (les ostéoclastes).

Les ostéoblastes

Les ostéoblastes sont les cellules osseuses dérivées des CSMs de la moelle osseuse (Figure 2.2). Ils sont responsables de la synthèse de la matrice osseuse et de sa minéralisation subséquente. La différenciation des CSMs en ostéoblastes matures est contrôlée par les hormones (parathormone (PTH)), vitamines (vitamine D) et facteurs de croissance dont, entre autres, les BMPs et les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF) (Hughes-Fulford et Li, 2011). Le processus de différenciation des CSMs en ostéoblastes matures requiert plusieurs étapes (Marie, 2001). Ce processus de différenciation implique la stimulation des CSMs par des facteurs de croissance (dont les BMPs) qui activent des molécules de signalisation intracellulaires (Smads). Ces molécules de signalisation vont alors interagir avec des facteurs de transcription afin de permettre l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la différenciation ostéogénique. Cependant, suivant le signal reçu, les CSMs peuvent aussi se différencier en cellules des lignées adipocytaires ou chondrocytaires (Du *et al.*, 2010) (Figure 2.2).

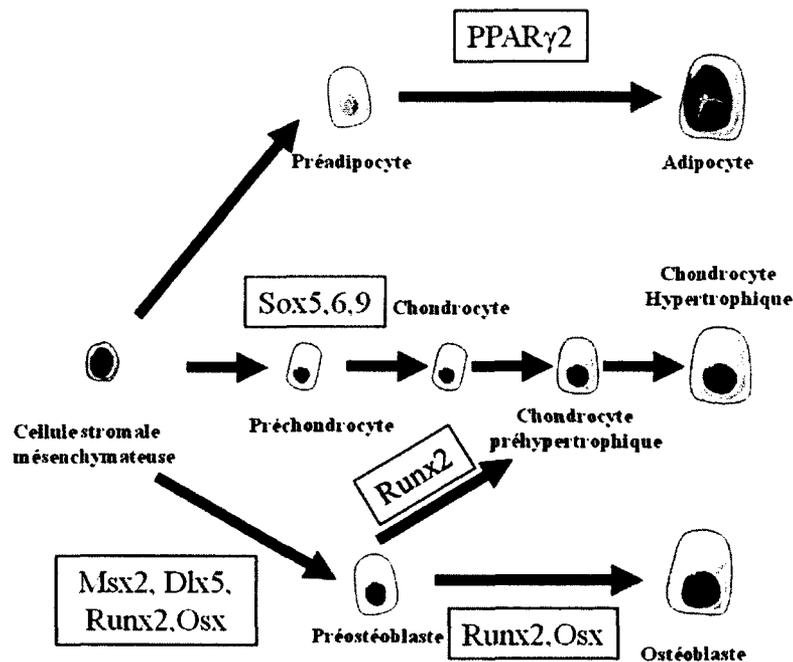


Figure 2.2: Différenciation des CSMs en adipocytes, chondrocytes ou ostéoblastes (Servier Medical Art; Harada et Rodan, 2003; Du *et al.*, 2010)

Les différenciations ostéogénique, adipogénique et chondrogénique, mettent en œuvre différents facteurs de transcription. Par exemple, les facteurs de transcription Runx2 et Dlx5 jouent un rôle clé dans la différenciation des CSMs en ostéoblastes, tandis que le *peroxisome proliferator-activated receptor gamma2* (PPAR γ 2) est impliqué dans leur différenciation en adipocytes (Lecka-Czernik *et al.*, 2002; Harada et Rodan, 2003). Sox9 (*sex determining region Y-box 9*) régule la différenciation des CSMs en chondrocytes (Harada et Rodan, 2003; Du *et al.*, 2010).

Les ostéoblastes se trouvent à la surface du tissu osseux en croissance. Ils interviennent de façon directe sur la formation osseuse. Ils synthétisent en effet les différentes protéines constitutives de l'ECM osseuse telles que le collagène de type I, l'ostéocalcine (OC), la BSP ainsi que l'ALP. Les ostéoblastes sont donc des cellules riches en organites et mitochondries indispensables à la synthèse et sécrétion protéique comme le réticulum endoplasmique rugueux et l'appareil de Golgi. La minéralisation de cette matrice organique conduit à l'accumulation de calcium et de phosphate dans la partie cytoplasmique des ostéoblastes où vont se former les complexes phosphates tricalciques (Anderson, 2003). Les cristaux d'hydroxyapatite (HAP) ensuite formés sont libérés dans le milieu et vont se déposer entre les fibres de collagène (Nudelman *et al.*, 2010). Le phénomène de minéralisation aboutit à l'emprisonnement progressif des ostéoblastes dans la matrice qu'ils synthétisent et ils deviennent alors des ostéocytes. Un autre devenir des ostéoblastes peut également être leur dédifférenciation en cellules bordantes ou leur mort par apoptose. Les ostéoblastes interviennent également de façon indirecte sur la résorption osseuse en synthétisant des protéines capables de réguler la différenciation et l'activité des ostéoclastes.

Les ostéoclastes

À la différence des ostéoblastes, les ostéoclastes sont des cellules multinuclées, qui sont issues de la différenciation de cellules souches hématopoïétiques en cellules myéloïdes progénitrices puis en préostéoclastes qui fusionnent afin de donner des ostéoclastes matures (Figure 2.3). Ce processus de différenciation ostéoclastique ou ostéoclastogénèse se déroule sous l'influence de deux cytokines principales: M-CSF et RANKL (Yasuda *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2007).

Ces deux cytokines sont nécessaires à la formation des ostéoclastes mais n'interviennent pas au même moment dans les étapes de différenciation (Zhao *et al.*, 2007; Boyle *et al.*, 2003). Le M-CSF intervient directement sur les cellules souches hématopoïétiques afin de former les préostéoclastes, tandis que la co-stimulation par M-CSF et RANKL va permettre la fusion des préostéoclastes (Boyle *et al.*, 2003; Väänänen et Laitala-Leinone, 2008). Finalement RANKL induit la maturation de la cellule multinucléée en ostéoclaste mature capable de résorber l'os (Nakagawa *et al.*, 1998; Väänänen et Laitala-Leinone, 2008).

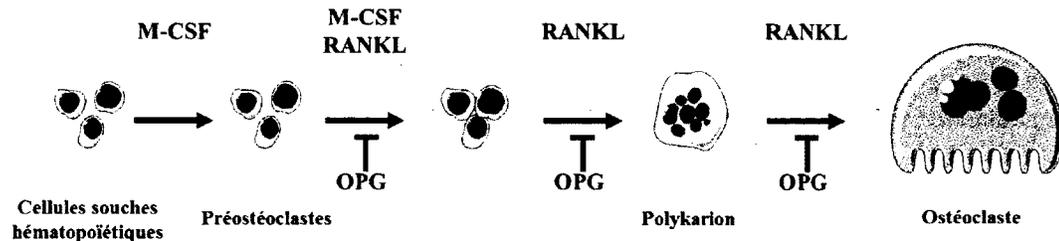


Figure 2.3: Différenciation des cellules souches hématopoïétiques en ostéoclaste (Servier Medical Art; Yasuda *et al.*, 1998; Boyle *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2007). OPG : ostéoprotégérine

RANKL est une cytokine synthétisée par les ostéoblastes qui assure également la survie des ostéoclastes matures (Yasuda *et al.*, 1998). La synthèse de RANKL permet la ségrégation des ostéoclastes dans le tissu par effet chimiotactique en régulant l'expression du gène codant pour le récepteur S1PR1 (récepteur de sphingosine-1 phosphate) (Ishii *et al.*, 2009 et 2010). La sphingosine-1 phosphate (SP-1) est un sphingolipide circulant. Lors des étapes de différenciation, la présence de RANKL va diminuer l'expression de S1PR1 et donc l'affinité des ostéoclastes pour SP-1 (Ishii *et al.*, 2009 et 2010). Les ostéoclastes, durant leur maturation, vont ainsi migrer à la surface de l'os où SP-1 est moins présente (Ishii *et al.*, 2009 et 2010). La vitamine 1alpha, 25-dihydroxyvitamine D3 (1,25-(OH)₂D₃) ainsi que la PTH peuvent induire une augmentation de l'expression du gène codant pour RANKL (Okada *et al.*, 2002).

L'ostéoclastogénèse est un phénomène également régulé par les ostéoblastes *via* la synthèse de l'ostéoprotégérine (OPG) (Kusumi *et al.*, 2005). Cette protéine, lorsqu'elle est en solution, se lie à RANKL bloquant son interaction avec son récepteur présent à la

surface des précurseurs ostéoclastiques et donc son action sur l'ostéoclastogénèse (Stolina *et al.*, 2009).

Les ostéoclastes interviennent dans une des premières étapes du remodelage osseux et sont responsables de la dégradation de la matrice organique osseuse en synthétisant des enzymes telles les métalloprotéinases matricielles (MMPs) et cathepsine K (Andersen *et al.*, 2004; Troen, 2006; Väänänen et Laitala-Leinone, 2008). Grâce à des pompes ATPases (ATP : adénosine tri-phosphate), les ostéoclastes libèrent également des protons qui en acidifiant localement le pH sont capables de dégrader la partie inorganique de la matrice osseuse (Baron *et al.*, 1985). Durant ce processus, deux structures particulières sont observées : la formation de la zone d'ancrage ou de scellement par l'intermédiaire des intégrines et la formation de la lacune de Howship (cavité creusée par l'ostéoclaste) (Figure 2.4) (Zhao et Ross, 2007; Väänänen et Laitala-Leinone, 2008).

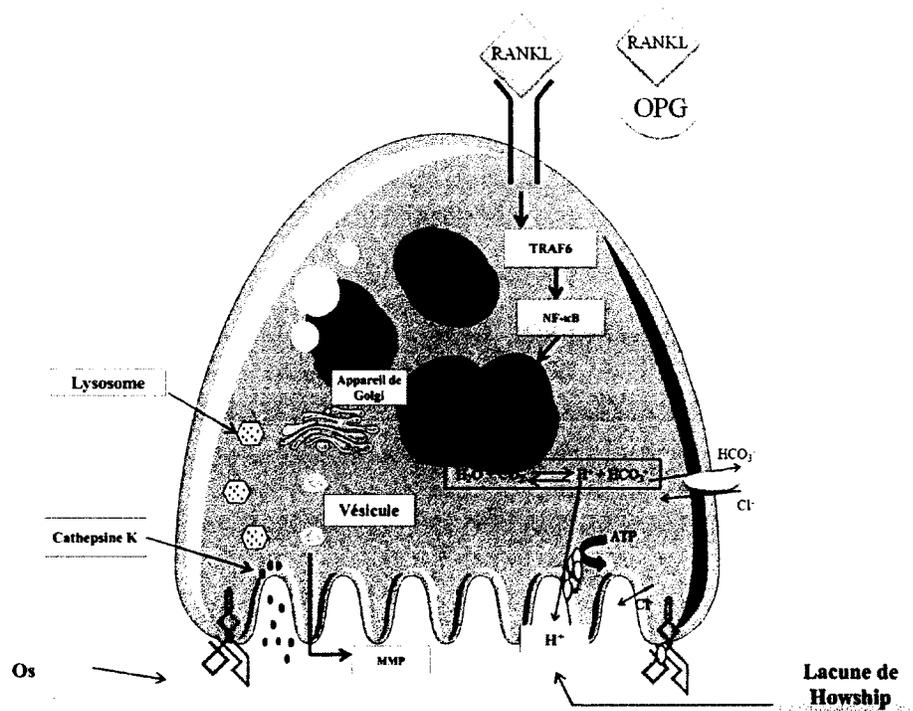


Figure 2.4 : Structure d'un ostéoclaste adhérant à une lamelle osseuse (Servier Medical Art; Zhao et Ross, 2007; Väänänen et Laitala-Leinone, 2008). NF-κB : Nuclear factor kappa b; TRAF6 : TNF receptor-associated factor 6.

Les ostéocytes

Les ostéocytes représentent près de 95 % de l'ensemble des cellules osseuses (Bonewald, 2007). Ils proviennent d'ostéoblastes matures emprisonnés dans la matrice. Leur position au cœur même du tissu osseux leur confère un rôle clé dans sa régénération *via* la synthèse de molécules de signalisation (M-CSF, RANKL, sclérostine) en réaction aux sollicitations mécaniques par exemple (Lin *et al.*, 2009; Heino *et al.*, 2009).

La morphologie des ostéocytes est légèrement modifiée par rapport à celle des ostéoblastes puisqu'ils possèdent de nombreuses dendrites disposées dans des canalicules. Ces dendrites permettent d'établir des jonctions intercellulaires communicantes de type gap entre les ostéocytes (Shapiro, 1988). Les ostéocytes sont également capables d'interagir avec les autres cellules osseuses. Ils peuvent ainsi être considérés comme des biocapteurs de l'état de l'os régulant le remodelage osseux. De plus, les ostéocytes synthétisent et sécrètent des protéines de l'ECM mais de façon moins importante que les ostéoblastes. Par rapport aux ostéoblastes qui ont une durée de vie variant de 1 à 10 semaines (Fernandez-Tresguerres Hernandez-Gil *et al.*, 2006) et aux ostéoclastes ayant une longévité de 2 semaines (Parfitt, 1994), les ostéocytes avec une demi-vie de 25 ans vivent beaucoup plus longtemps (Knothe Tate *et al.*, 2004).

2.1.3. L'équilibre ostéoblastes/ostéoclastes : le remodelage osseux

Sous l'action des ostéoclastes et des ostéoblastes l'os est en perpétuel renouvellement (Martin, 2007). Un adulte renouvelle environ 5 % d'os cortical et jusqu'à 20 % d'os trabéculaire chaque année (Fernandez-Tresguerres Hernandez-Gil *et al.*, 2006). Ce renouvellement requiert un ensemble de cellules regroupées sous forme d'unités BMU (unité multicellulaire de base) (Raggat et Partridge, 2010) (Figure 2.5).

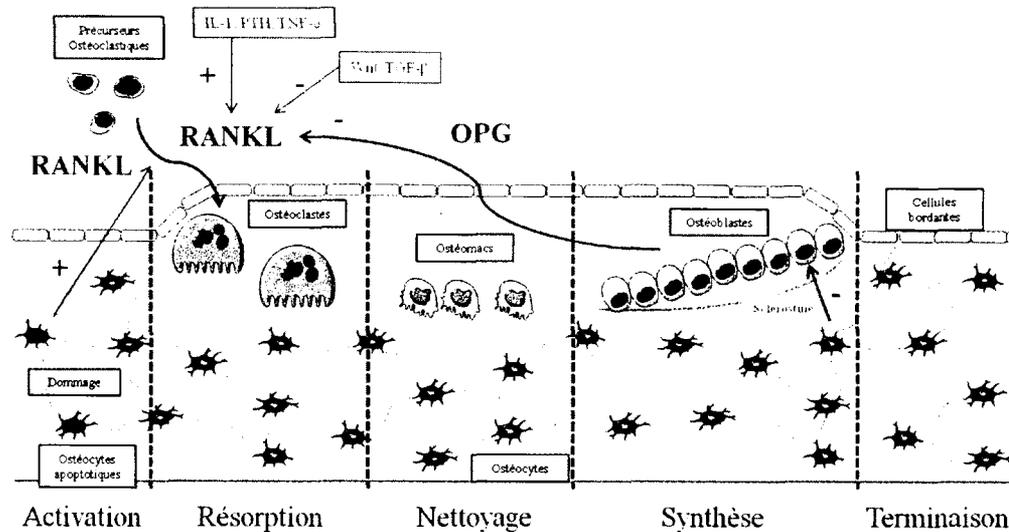


Figure 2.5 : Le remodelage osseux : l'importance de la BMU (Servier Medical Art; Raggat et Partridge, 2010; Drevelle et Fauchoux, 2013)

Les BMU ont une durée de vie variant de 6 à 9 mois et possèdent suivant leur localisation une taille différente (os cortical : 80 μm , os trabéculaire : 50 μm) (Manolagas, 2000; Eriksen, 2010). Ces BMU impliquent plusieurs phases qui sont : activation, résorption, nettoyage, synthèse et terminaison (Raggat et Partridge, 2010). La phase d'activation de la BMU est induite par les ostéocytes après l'application de forces mécaniques. Cette phase se traduit par la différenciation des précurseurs ostéoclastiques et par leur activation. L'endommagement des ostéocytes par les stress mécaniques provoque leur apoptose et la libération dans le milieu de différents facteurs tel M-CSF et RANKL provoquant l'ostéoclastogénèse (Heino *et al.*, 2009). Lorsqu'ils sont différenciés les ostéoclastes vont pouvoir dégrader la matrice durant 30 jours. Une fois la dégradation locale du tissu osseux effectuée, les ostéoclastes vont mourir par apoptose et les débris non dégradés vont être digérés par les « ostéomacs ». La phase suivante permet la synthèse d'une nouvelle matrice osseuse grâce au recrutement, la prolifération et la différenciation des préostéoblastes en ostéoblastes matures. Lors du remodelage osseux, les ostéoblastes matures vont synthétiser environ 2 μm^3 par jour de matrice jusqu'à la formation complète d'une couche d'une épaisseur de 10 à 15 μm (Toppets *et al.*, 2004; Fernandez-Tresguerres Hernandez-Gil *et al.*, 2006). Cette étape plus longue que l'étape de dégradation dure environ 150 jours et permet ainsi la minéralisation du tissu osseux néo-synthétisé (Eriksen *et al.*, 1984).

2.2. La matrice extracellulaire

Tel que brièvement mentionné dans la section précédente, l'ECM osseuse est composée de deux grandes parties, l'une inorganique et l'autre organique.

2.2.1. La matrice inorganique

La matrice inorganique compte pour 65 % de la masse sèche osseuse. Elle représente un réservoir de minéraux qui vont être libérés lors du remodelage osseux. Les différents éléments présents dans la matrice sont le calcium, le phosphate, le magnésium, le sodium, le potassium, le fluor ainsi que le manganèse (Tableau 2.1).

La partie inorganique de la matrice osseuse est composée en grande majorité d'ions calcium et phosphate qui se combinent afin de former des cristaux de HAP. Ces cristaux peuvent également comporter des substitutions des groupements phosphate par des groupements carbonate (Fernandez-Tresguerres Hernandez-Gil *et al.*, 2006).

Tableau 2.1 : Composition de la matrice osseuse bovine (LeGeros *et al.*, 1995)

Ion	% massique
Calcium	34.8
Phosphore	15.2
Sodium	0.9
Magnésium	0.72
Potassium	0.03
Carbonate	7.4
Fluorure	0.03
Chlorure	0.13
Pyrophosphate	0.07
Total matrice inorganique	65
Total matrice organique	25
H ₂ O absorbée	10
Trace d'éléments (Sr, Pb, Zn, Cu, Fe...)	

La formation de ces cristaux débute dans les vésicules produites soit par des ostéoblastes matures soit par des chondrocytes (Anderson, 2003). Les vésicules extracellulaires ont un diamètre de 100 nm (Hoshi et Ozawa, 2000). L'accumulation de calcium et de phosphate dans les vésicules jusqu'à une concentration de saturation permet la nucléation de particules de HAP proche de la membrane (Anderson 2003). Les cristaux vont ensuite croître jusqu'à un possible éclatement de la vésicule. Cette accumulation de calcium et de phosphate est accrue par l'intervention de différentes molécules au voisinage de la membrane (ALP, pyrophosphatase, annexine II phosphatidylsérine) (Anderson 2003). Une fois libérés dans le milieu, les cristaux d'HAP peuvent continuer de croître si la présence de calcium et de phosphate le permet. La minéralisation du tissu se poursuit alors par l'interaction entre le cristal de HAP en croissance et les fibrilles de collagène (Anderson 2003). Le phénomène impliqué n'est pas totalement élucidé.

Il semble que l'intervention de protéines telles que la BSP soit cependant primordiale dans l'initiation de ce processus (Huang *et al.*, 2008; Roach 1994; Tye *et al.* 2003). Il a ainsi été mis en évidence, après extraction des protéines présentes dans la matrice osseuse (partie inorganique et partie organique), que la BSP était présente dans les différentes fractions extraites. Il est alors possible que la BSP soit à la fois liée au collagène de type I mais également à l'HAP (Huang *et al.*, 2008). De plus, la présence de BSP semble favoriser la nucléation du phosphate de calcium (Yang *et al.*, 2010).

2.2.2. La matrice organique

La matrice organique est principalement constituée de collagène de type I. D'autres éléments constitutifs de la matrice comme les protéoglycanes, la BSP ainsi que des protéines adhésives comme la fibronectine sont également présentes en plus faible quantité (Marquis *et al.*, 2009; Drevelle et Faucheux, 2013) (Tableau 2.2).

Le collagène de type I est synthétisé par les ostéoblastes matures. Il se présente tout d'abord sous la forme d'un procollagène de type I formé d'une triple hélice constituée par deux chaînes $\alpha 1$ et une chaîne $\alpha 2$ (Gelse *et al.*, 2003). Les chaînes ont environ 1000 acides aminés et comportent le motif $(\text{Gly-X-Y})_n$, la glycine, le plus petit acide aminé, permettant la formation d'une hélice par sa présence tous les 3 acides aminés (Gelse *et al.*, 2003). La cohésion de l'hélice est permise par des prolines et hydroxyproline et la formation de ponts hydrogène. Le procollagène a une longueur de 300 nm pour un diamètre de 1,5 nm (Gelse *et al.*, 2003). Une fois sécrétée dans l'espace extracellulaire, les extrémités N et C-

terminales du procollagène sont clivées par des protéases provoquant ainsi l'assemblage du collagène en fibrilles avec une périodicité de 67 nm (Gelse *et al.*, 2003). La stabilité des fibrilles est alors assurée par des interactions entre la lysine et l'hydroxylysine due à la formation d'un réseau réticulé sous l'influence de lysine hydroxylase et de lysyl oxidase. L'hydratation de ces fibrilles de collagène organisées sous forme de fibres module les propriétés élastiques de l'os (Gautieri *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2012). En effet, Gautieri *et al.* (2011) ont ainsi montré que des fibres de collagène hydratées avaient un module de Young inférieur aux fibres de collagènes déshydratées (1,2 GPa vs 2,5 GPa), ce phénomène étant dû à une organisation des fibres plus compacte en absence d'eau.

La matrice contient également des protéines non collagéniques telle l'ostéocalcine (OC), une protéine Gla (acides γ -carboxyglutamique) qui va être sécrétée par les ostéoblastes et permettre une régulation de la minéralisation (Lee *et al.*, 2000; Hoang *et al.*, 2003). De plus, l'OC peut également influencer la différenciation des précurseurs ostéoclastiques. Ainsi, l'interaction d'un peptide extrait de l'OC (résidus 7-36) peut induire une augmentation de la différenciation de cellules Mac-1+ c-fms+ qui sont des précurseurs ostéoclastiques lorsque ce peptide est utilisé en combinaison avec M-CSF et RANKL (Ishida et Amano, 2004).

La matrice est également constituée de nombreuses protéines d'adhésion permettant aux cellules osseuses ostéoblastes et ostéoclastes d'interagir avec la matrice *via* les intégrines régulant ainsi leur migration, prolifération et différenciation.

Tableau 2.2 : Protéines non collagéniques constitutives de la matrice organique (Marquis *et al.*, 2009; Drevelle et Fauchaux, 2013)

Protéine	Masse molaire et modifications post-traductionnelles	Effet sur les ostéoblastes	Effets sur les ostéoclastes	Références
OC	- 49 acides aminés (5-8 kDa) - carboxylation des 3 acides γ -carboxyglutamique (Gla) dépend de la vitamine K (OC porcine) - Structure stabilisée par des ponts disulfure Cys ₂₃ -Cys ₂₉ - Protéine chargée négativement en surface capable de chélater 5 ions calcium	↓ Minéralisation	↑ Différenciation et maturation des précurseurs des ostéoclastes par des peptides extraits de l'OC	Grafeneau <i>et al.</i> , 2000; Hoang <i>et al.</i> , 2003; Lee <i>et al.</i> , 2000; Ishida et Amano, 2004
Ostéonectine	- 32-35 kDa - Glycoprotéine acide constituée d'une seule chaîne riche en résidus cystéine - Glycosylation post-traductionnelle induisant un poids moléculaire de 45 kDa	↑ Minéralisation	↑ Adhésion cellulaire	Sodek <i>et al.</i> , 2002; Villarreal <i>et al.</i> , 1989
Protéines SIBLING (small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein)				
Ostéopontine (BSP-1)	- 301 acides aminés (rat) - Modifications post-traductionnelles (phosphorylation sur la sérine, O/N-glycosylation) induisant un poids moléculaire de 60 kDa - Motif d'interaction cellulaire: RGD	↑ Adhésion ↑ Différenciation	↑ Adhésion ↑ Résorption osseuse	Sodek <i>et al.</i> , 2002; Alford et Hankenson, 2006; Qin <i>et al.</i> , 2004
BSP	- 327 acides aminés (33-34 kDa) - Modifications post-traductionnelles (phosphorylation Ser/Thr, sulfatation tyrosine, N/O-glycosylation) augmentation du poids moléculaire de la BSP à 75 kDa - Motif d'interaction cellulaire: RGD	↑ Adhésion ↑ Minéralisation	↑ Adhésion ↑ Différenciation ↑ Résorption osseuse	Alford et Hankenson, 2006; Valverde <i>et al.</i> , 2005; Yang <i>et al.</i> , 2010
SLRP (Small leucine-rich proteoglycans)				
Type I (biglycane)	- 200-350 kDa - Coeur protéique riche en leucine (45 kDa) avec deux chaînes courtes de glycosaminoglycane (GAG) chondroïtine/dermatane sulfates	↑ Différenciation ↑ Minéralisation	↑ Ostéoclastogénèse due à des ostéoblastes non fonctionnels	Bi <i>et al.</i> , 2006
Type II (decorine)	- 90-140 kDa - Coeur protéique riche en leucine (40 kDa) avec une chaîne GAG chondroïtine sulfate/dermatane sulfates	↓ Minéralisation en modulant l'assemblage du collagène		Mochida <i>et al.</i> , 2009
Protéines adhésives				
Fibronectine	- 2 sous unités de 235-250 kDa liées par 2 liaisons disulfide - 3 types d'unité: 12 types I répétés, 2 types II répétés et 15-17 types III répétés - Motif d'interaction cellulaire : RGD localisé sur la répétition III ₁₀ et son site synergique PHSRN localisé sur la répétition III ₉	↑ Adhésion ↑ Survie ↑ Prolifération ↑ Différenciation ↑ Minéralisation	↓ Ostéoclastogénèse ↑ Résorption osseuse	Pankov et Yamada, 2002; Gramoun <i>et al.</i> , 2010
Thrombospondine	- 120-150 kDa - Motif d'interaction cellulaire : RGD	↑ Différenciation	↑ Résorption cellulaire	Alford et Hankenson, 2006

2.3. Les intégrines

Les intégrines sont des récepteurs hétérodimériques transmembranaires constitués de deux sous-unités : α et β (Hynes, 2002, Ruoslahti et Pierschbacher, 1987). Elles sont responsables de l'adhésion cellulaire et assurent la liaison entre les protéines du cytosquelette et les protéines de l'ECM. La reconnaissance par les intégrines de séquences d'acides aminés présentes dans les protéines de l'ECM va ainsi permettre l'adhésion cellulaire. Un nombre de 24 intégrines a pour le moment été identifié, avec 18 sous-unités α et 8 sous-unités β (Hynes, 2002).

2.3.1. Structure

L'analyse cristallographique par rayons X de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ a montré que les deux sous-unités présentaient une tête arrondie surmontant une tige (Xiong *et al.*, 2001). Xiong *et al.* ont également mis en évidence des différences et des similitudes au niveau de la structure des deux sous-unités. Tout d'abord, pour chacune des sous-unités α et β , la tige traverse la membrane plasmique cellulaire et possède un court domaine cytoplasmique (Campbell et Humphries, 2011) (Figure 2.6). La sous-unité α est composée d'une séquence de 1 000 acides aminés formant plusieurs sous-domaines (*β -propeller*, *calf-1*, *calf-2* et *thigh*).

Les 400 premiers acides aminés forment le domaine appelé « β -propeller » qui est majoritairement composé de feuillets bêta antiparallèles et possède un site permettant l'interaction *via* la coordination d'ions avec la sous-unité β (Xiong *et al.*, 2001). Par exemple, la surface de contact entre le domaine *thigh* formé de feuillets β et le domaine *β -propeller* permet une rotation et donc un changement conformationnel pouvant être induit par la présence d'ions calcium dans le domaine *β -propeller* (Campbell et Humphries, 2011). La sous-unité α possède une partie plus rigide à la base de la tige due à la grande hydrophobicité de l'interface entre *calf-1* et *calf-2*. La sous-unité β est, quant à elle, constituée d'un domaine β -I, suivi d'un domaine hybride et de 4 domaines EGF (*Epidermal Growth Factor*), pour finir par une queue β (Xiong *et al.*, 2001; Campbell et Humphries, 2011).

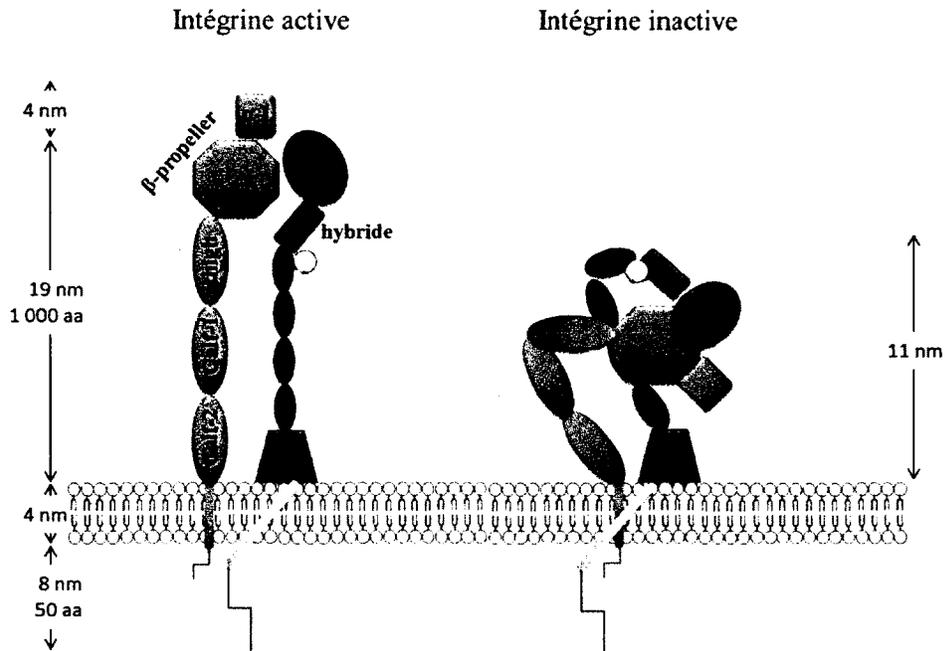


Figure 2.6 : Organisations d'une intégrine constituée de deux sous-unités α et β sous formes active et inactive (Hynes, 2002; Campbell et Humphries, 2011)

Deux phénomènes sont impliqués dans l'activation des intégrines. Dans un premier temps, une intégrine va s'activer en présentant son site de liaison aux protéines de l'ECM pour favoriser une interaction avec son ligand. Le changement conformationnel induit par cette interaction se produit sur les deux sous-unités (α et β) de l'intégrine aussi bien au niveau extracellulaire que dans la partie cytoplasmique. Ce phénomène d'activation fait intervenir plusieurs cations (magnésium, manganèse, calcium), le magnésium se liant directement au site MIDAS (*Metal ion-dependent adhesion site*) (Lee *et al.*, 1995). Le calcium se lie sur deux sites, l'un de faible affinité (ADMIDAS : site adjacent à MIDAS) et agissant comme inhibiteur, et l'autre de haute affinité (SyMBS : *synergistic metal ion binding site*) permettant une synergie du signal (Campbell et Humphries, 2011). Ainsi lorsqu'un ion manganèse vient se substituer au calcium sur le site ADMIDAS, un changement structural se produit menant à l'activation de l'intégrine. Dans un deuxième temps, les intégrines ne possédant pas d'activité enzymatique, le regroupement d'un grand nombre d'intégrines s'avère nécessaire afin de favoriser une plus grande interaction avec les molécules effectrices (taline) présentes dans le cytoplasme (Campbell et Humphries, 2011).

Certaines intégrines peuvent être spécifiques pour des protéines particulières (Marquis *et al.*, 2009; Drevelle et Fauchaux, 2013) (Tableau 2.3.). Ainsi, l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ ciblera la fibronectine tandis que l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ interagira avec la fibronectine, la vitronectine et la BSP *via* notamment la séquence d'acides aminés RGD. Une protéine donnée peut être également reconnue par plusieurs intégrines. Le collagène de type I, dont l'un des sites de reconnaissance est la séquence DGEA (Staatz *et al.*, 1991), est ainsi reconnu par trois intégrines, $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_3\beta_1$ (Yamamoto *et al.*, 1995; Jikko *et al.*, 1999). L'expression des intégrines au niveau membranaire est fonction du type cellulaire considéré. Par exemple, dans le tissu osseux, les CSMs expriment majoritairement les intégrines de type $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_2\beta_1$ (Ode *et al.*, 2010). Cependant, l'expression des intégrines changent avec l'état de différenciation des cellules puisque les ostéoblastes exprimeront quant à eux aussi bien les sous-unités α_1 - α_6 , α_v que les sous unités β_1 , β_3 et β_5 (Lai et Cheng, 2005). De même, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, qui n'est pas exprimée chez les ostéoclastes immatures, est l'intégrine majoritaire à la surface des ostéoclastes matures (Inoue *et al.*, 2000; Novack et Faccio, 2011). Cette intégrine est responsable de la formation de la zone d'ancrage entre les ostéoclastes matures et la matrice osseuse (Nakamura *et al.*, 1999).

Tableau 2.3 : Intégrines : leurs ligands et leurs fonctions (Marquis *et al.*, 2009; Drevelle et Fauchoux, 2013)

Sous unité β	Sous-unité α	Ligands	Fonction	Références
β_1	α_1	Collagènes	↑ Différenciation ostéoblastique induite par la BMP-2 - Implication dans l'adhésion des ostéoclastes et la résorption osseuse	Jikko <i>et al.</i> , 1999; Helfrich <i>et al.</i> , 1996
	α_2	Collagènes		
	α_3	Collagènes, fibronectine, thrombospondine		
	α_4	Fibronectine		
	α_5	Fibronectine		
	α_6	Laminines		
	α_v	Fibronectine		
β_3	α_v	BSP, fibronectine, ostéopontine, thrombospondine, vitronectine	<p>Adhésion et différenciation des ostéoblastes : Anticorps bloquants dirigés contre $\alpha_v\beta_3$ inhibent la différenciation des ostéoblastes induite par la BMP-2</p> <p>Adhésion et fonction des ostéoclastes Intégrine majoritaire dans les ostéoclastes matures: -souris sans le gène β_3 ont des ostéoclastes dis-fonctionnels (pas de bordure plissée et de formation de la zone d'ancrage (actine)) menant à l'ostéopétrose -la surexpression de la sous-unité α_v favorise la différenciation des ostéoclastes</p>	<p>Rodan et Rodan, 1997; Lai et Cheng, 2005</p> <p>Faccio <i>et al.</i>, 2003a, 2003b</p>
β_5	α_v	Vitronectine	<p>↑ Adhésion des ostéoblastes (<i>in vitro</i>) ↓ Différenciation en ostéoclaste -Souris sans le gène codant pour la sous-unité β_5 présentent une différenciation en ostéoclaste accélérée</p>	Lane <i>et al.</i> , 2005

2.3.2. Organisation des protéines du cytosquelette et signalisation intracellulaire

Les ostéoblastes

Une fois les intégrines activées, un signal de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule est transmis permettant le regroupement et l'organisation des protéines du cytosquelette en structures d'adhésion particulières appelées complexes focaux (Geiger *et al.*, 2001; Critchley, 2009). Ces complexes focaux sont principalement formés de paxilline et de vinculine, il s'agit de la première structure formée au contact des intégrines avec l'ECM (Geiger *et al.*, 2001). Une fois les complexes focaux formés, ils peuvent évoluer en points focaux d'adhésion ou disparaître (Geiger *et al.*, 2001).

Les points focaux d'adhésion sont constitués de protéines structurales telles la taline, la vinculine et de protéines de signalisation FAK et Src ainsi que plus de cent cinquante autres protéines qui constituent l'adhésome (Geiger *et al.*, 2001; Zaidel-Bar *et al.*, 2007) (Figure 2.7).

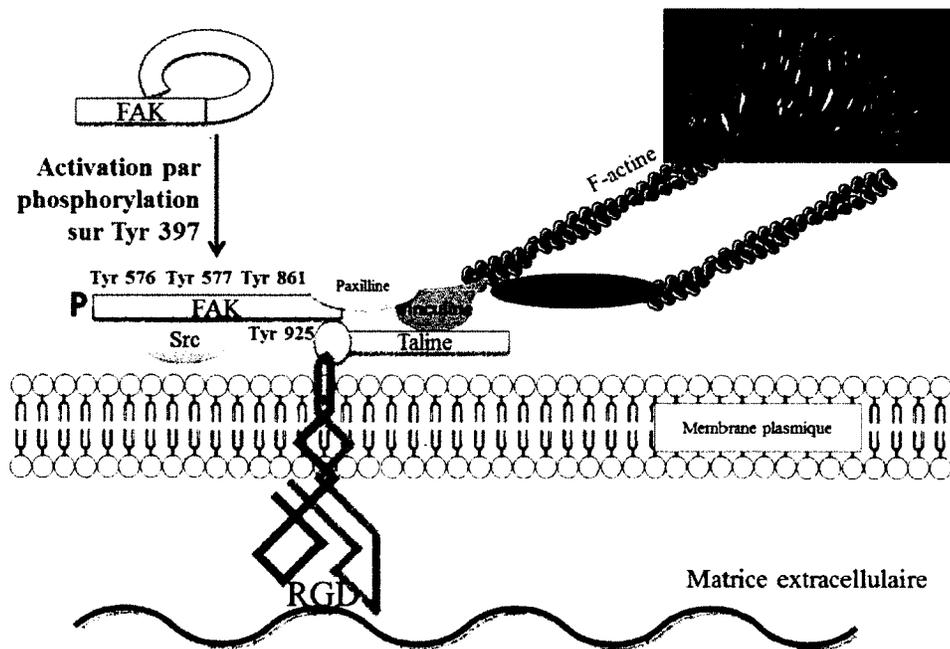


Figure 2.7 : Schéma simplifié de l'organisation d'un point focal et activation de la FAK (Geiger *et al.*, 2001; Critchley, 2009)

La taline, une fois les intégrines activées, va pouvoir interagir avec la vinculine et la FAK. La taline est une protéine constituée de 2 500 acides aminés qui va principalement interagir par l'intermédiaire de son extrémité N-terminale avec la FAK tandis que son domaine « tige » (contenant des hélices alpha) interagit avec la vinculine au niveau des hélices alpha *via* trois sites (607-636,852-876,1944-1969) (Brakebusch et Fässler, 2003; Critchley, 2009). De plus, la taline peut interagir directement avec l'actine G et F permettant ainsi la polymérisation de l'actine G (actine globulaire) en F (filament d'actine) (Muguruma *et al.*, 1990). L'interaction entre le cytosquelette et les intégrines implique la vinculine *via* la tige des sous unités β (Janssen *et al.*, 2006; Wen *et al.*, 2009).

L'activation de la FAK, lors de la formation du point focal d'adhésion, est un facteur important en termes de signalisation pour les ostéoblastes. Tout d'abord, c'est la partie C-terminale de la FAK qui va déterminer sa localisation au niveau des points focaux par l'interaction avec les protéines paxilline et taline (Chen *et al.*, 1995; Hildebrand *et al.*, 1995).

L'activation de la FAK débute par son autophosphorylation sur la tyrosine (Tyr) 397 (Schaller *et al.*, 1994). La phosphorylation de la Tyr 397 va accroître l'affinité du domaine SH2 pour les protéines de la famille des Src (Schlaepfer et Mitra, 2004). Ainsi, les Tyr 576, 577, 861 ainsi que 925 seront ensuite phosphorylées. FAK peut activer les MAPKinases JNK et ERK1/2 *via* la phosphorylation de sa Tyr 925 qui interagit alors avec Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*). L'activation de la FAK va également permettre un contrôle de la motilité de la cellule *via* son activité au niveau des points focaux. En effet lorsque la Tyr 925 n'est pas phosphorylée, le domaine SH3 va interagir avec ASAP1 (*Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain containing protein 1*) et ainsi inhiber l'activité des RhoGTPases menant à une désorganisation du point focal et des fibres d'actine (Schlaepfer et Mitra, 2004). Lorsque la Tyr 925 est activée, la FAK va promouvoir les interactions entre la taline et les intégrines *via* l'activation par phosphorylation de PIPKI γ (phosphatidylinositol(4) phosphate 5 kinase type I γ) permettant une interaction avec la taline et la formation de point focaux (Schlaepfer et Mitra, 2004; Lee *et al.*, 2005).

Les ostéoclastes

Les ostéoclastes matures vont adhérer à la surface de l'os par l'intermédiaire des intégrines. L'organisation des intégrines $\alpha_v\beta_3$ permet la formation des podosomes et de délimiter une zone étanche entre l'ostéoclaste et l'ECM osseuse (Luxenburg *et al.*, 2006).

Cette zone évolue ensuite en lacune de Howship lors de la dégradation de l'ECM. Faccio *et al.* (2003b) ont ainsi montré l'importance de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ pour l'activité des ostéoclastes. En effet, chez les souris $\beta_3^{-/-}$, en raison de l'absence de la formation de la lacune de Howship, les ostéoclastes ne sont pas fonctionnels. De plus, Pfaff et Jurdic (2001) ont montré que, chez les ostéoclastes de poulet, la localisation des podosomes est en périphérie de la cellule durant le processus de maturation (macrophage \rightarrow ostéoclastes) en présence de RANKL.

Régulation du comportement cellulaire par les intégrines

La fonction principale des intégrines n'est pas seulement de promouvoir l'adhésion des cellules à l'ECM mais également de réguler le comportement cellulaire en termes de survie, prolifération, différenciation et migration (Nakamura *et al.*, 1999; Oursler, 2010; Yan *et al.*, 2012). L'interaction des intégrines avec les différentes protéines de l'ECM permet l'organisation du cytosquelette cellulaire qui sert de signal de survie. De plus, l'interaction entre le collagène et l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ est impliquée dans la différenciation des préostéoblastes murins MC3T3-E1 par l'intermédiaire de l'activation de la FAK et de ERK1/2 (Takeuchi *et al.*, 1997).

Même si les intégrines servent de premier signal dans la survie des cellules osseuses et peuvent réguler leur différenciation, il existe d'autres facteurs, dont les BMPs, qui jouent un rôle important dans cette différenciation et la synthèse des protéines de l'ECM.

2.4. Régulation du comportement des cellules osseuses par les BMPs

2.4.1. Les sous-familles de BMPs

Les BMPs sont des protéines de la famille des TGF- β (*Transforming growth factor- β*) bien connues comme ayant un rôle dans la formation du tissu osseux et sa réparation (Kugimiya *et al.*, 2005; Al-Aql *et al.*, 2008). Ils permettent notamment la différenciation des CSMs en ostéoblastes puis en ostéocytes (Figure 2.8).

Les BMPs interviennent également lors du développement de l'embryon (développement du foie, système nerveux, poumon), de l'angiogénèse ou dans le processus inflammatoire (David *et al.*, 2007; Scharpfenecker *et al.*, 2007).

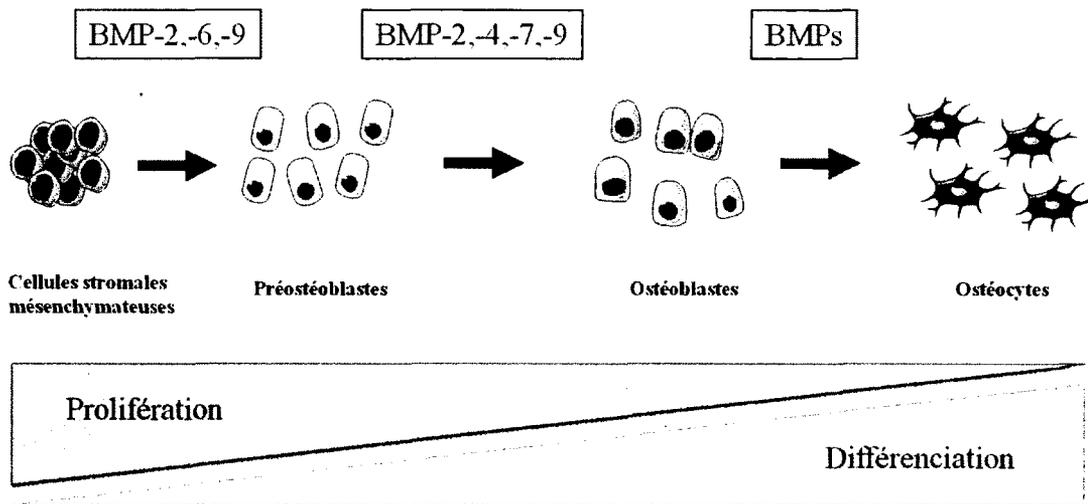


Figure 2.8 : Prolifération et différenciation des préostéoblastes issus des CSMs (Servier Medical Art; Harada et Rodan, 2003; Marquis *et al.*, 2009)

Ces BMPs ont été mises en évidence pour la première fois en 1965 lorsque le Dr Urist a pu observer la formation de structure osseuse *in vivo* après implantation d'os déminéralisé dans le muscle de lapin (Urist 1965). Plus tard, les BMPs ont été identifiées comme étant responsables de la propriété ostéoinductive de la partie organique de l'ECM osseuse (Urist et Strates 1971).

Depuis 1971, plus de 20 BMPs ont été identifiées et catégorisées en sous-familles en comparant leur homologie de séquence au niveau de l'extrémité C-terminale (Tableau

2.4.). Les membres des grandes sous-familles BMP-2/-4, BMP-3, BMP-5/-6/-7/-8/-8b, BMP-9/10 et BMP-12/-13/-14 ont des homologies de séquence d'environ 50 % (Bessa *et al.*, 2008). Par exemple, la BMP-7 possède une homologie de séquence de 87 % avec la BMP-5 alors que cette homologie chute à 60 % avec les BMP-2/-4 (Martinovic *et al.*, 2006).

Tableau 2.4 : Familles des BMPs et leurs récepteurs (Mazerbourg et Hsueh, 2006; Bessa *et al.*, 2008; Senta *et al.*, 2009)

Famille	BMP	Récepteur de type I	Récepteur de type II	Smad	Références
BMP-2/-4	BMP-2	ALK3/6	BMPRII/ActRIIa	Smad1/5/8	
	BMP-4	ALK3/6	BMPRII/ActRIIa	Smad1/5/8	
BMP-3	BMP-3	ALK4	ActRIIa	Smad2/3	
BMP-5/-6/-7/-8/-8b	BMP-5	ALK3/6		Smad1/5/8	Ro <i>et al.</i> , 2004
	BMP-6	ALK2/3/6	BMPRII/ActRIIa	Smad1/5/8	
	BMP-7	ALK2/3/6	BMPRII/ActRIIa	Smad1/5/8	Dudley <i>et al.</i> , 1995
	BMP-8	ALK3/6	BMPRII/ActRIIa	Smad1/5/8	Zhao et Hogan, 1996; Zhao <i>et al.</i> , 2001
	BMP-8b				Zhao et Hogan, 1996; Zhao <i>et al.</i> , 2001
BMP-9/-10	BMP-9	ALK1/2	BMPRII/ActRIIa	Smad1/5/8	David <i>et al.</i> , 2007, 2008; Scharpfenecker <i>et al.</i> , 2007
	BMP-10	ALK1/3/6	BMPRII/ActRIIa	Smad1/5/8	David <i>et al.</i> , 2007
BMP-12/-13/-14	BMP-12	ALK3/6	BMPRII/ActRIIa	Smad1/5/8	
	BMP-13	ALK3/6	BMPRII/ActRIIa	Smad1/5/8	
	BMP-14	ALK3/6	BMPRII/ActRIIa	Smad1/5/8	

ActR : récepteur de l'activine; ALK : récepteur activine; BMPRII : récepteur des BMPs

Les BMPs sont synthétisées sous la forme de prépropeptides composés de 400 à 500 acides aminés. Elles prennent par la suite leur forme active après modifications post-traductionnelles (clivage dans la séquence Arg-X-X-Arg du domaine en C-terminal) et en se dimérisant grâce à la formation de ponts disulfure (Aono *et al.*, 1995). Différentes

cellules peuvent synthétiser les BMPs (Marie, 2001; Suttapreyasri *et al.*, 2006; Bidart *et al.*, 2012).

Les ostéoblastes synthétisent les BMPs -2, -3, -4, -6, -7 et -8 (Marie, 2001; Suttapreyasri *et al.*, 2006) alors que la BMP-9 est synthétisée dans le foie par les cellules épithéliales biliaire intra-hépatiques et par les hépatocytes (Bidart *et al.*, 2012). De plus, 60 % des ARNm exprimés dans l'os endomembranaire humain codent pour les BMP-2, -5, -6 et -7 (Suttapreyasri *et al.*, 2006). On retrouve également en plus faible quantité l'ARN_m codant pour la BMP-9 dans l'os endomembranaire humain (Suttapreyasri *et al.*, 2006).

Récemment, la BMP-9 a été détectée dans le plasma à une concentration de 2-12 ng/mL (Bidart *et al.*, 2012). Elle peut circuler dans le sang sous deux formes, une forme active couplée à son prodomaine et sous une forme inactive qui peut être activée par la furine. La fraction active circulante de la BMP-9 est d'environ 60 % (Bidart *et al.*, 2012). De plus, la BMP-9 a également été récemment détectée dans les plaquettes (Osada *et al.*, 2012).

Or le processus de réparation endochondrale des fractures implique plusieurs étapes (Al-Aql *et al.*, 2008) (Figure 2.9). Tout d'abord, un traumatisme altère l'intégrité du tissu osseux et s'accompagne d'une rupture des vaisseaux. L'hémorragie induite est régulée par la formation d'un hématome ainsi que par le déclenchement d'une réaction inflammatoire. Différentes cytokines et facteurs de croissance (IL, BMP, TGF, VEGF) vont être synthétisés et recrutés afin de permettre : la formation du calus *via* les chondrocytes, le recrutement et la différenciation des ostéoclastes et la prolifération ainsi que la différenciation des cellules ostéoprogénitrices en cellules matures (ostéoblastes) (Radi et Khan, 2005). Quel est alors l'influence de la BMP-9 lors du phénomène de réparation osseuse ? Durant le processus d'hémostase après une fracture osseuse, les plaquettes sont parmi les premiers intervenants, leur dégranulation pourrait alors libérer de la BMP-9 au niveau du site de fracture. Mais cette hypothèse reste à vérifier *in vivo*. Par contre, la BMP-2 semble intervenir tout au long du processus de réparation osseuse (Al-Aql *et al.*, 2008; Cho *et al.*, 2002).

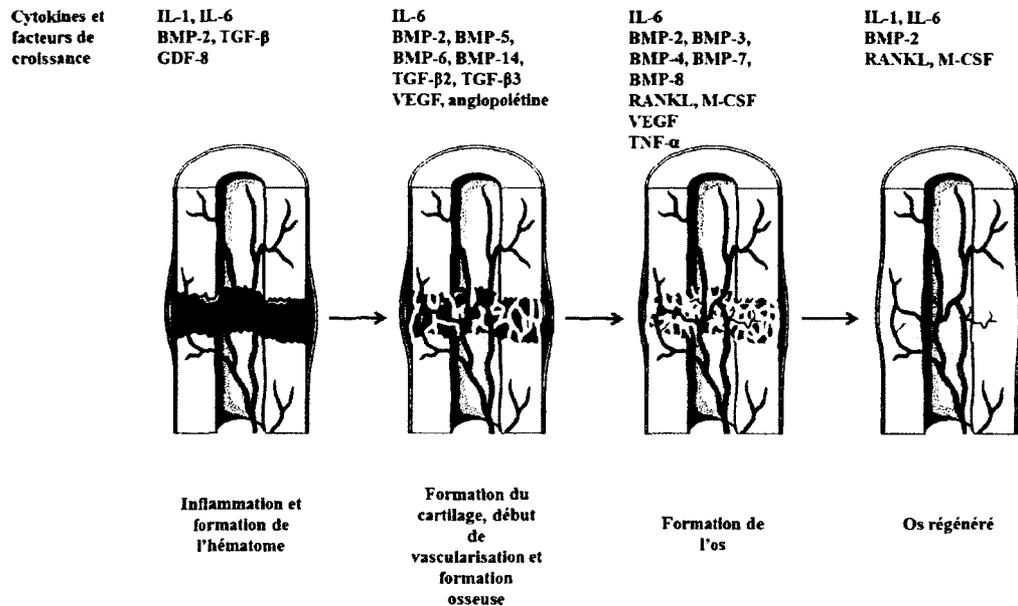


Figure 2.9 : Processus de réparation osseuse après fracture (Servier Medical Art; Al-Aql *et al.*, 2008). GDF : *Growth differentiation factor*

De plus, les effets de différentes BMPs sur les cellules osseuses ont été documentés dans de nombreuses études (Guicheux *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2004; Visser *et al.*, 2012) (Tableau 2.5.). Par exemple, la BMP-2 et la BMP-7 sont connues pour accroître l'activité de l'ALP dans les ostéoblastes murins mais également pour jouer un rôle dans la régulation de la prolifération, différenciation ainsi que l'apoptose des cellules osseuses (Yamaguchi *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2008). Ainsi, Zhang *et al.* (2012b) ont montré que la BMP-7 (10 - 400 ng/mL) était capable d'induire, suivant la dose, la prolifération et la différenciation après 4 et 7 jours des préostéoblastes MC3T3-E1. De plus, Hyzy *et al.* (2012) ont comparé l'impact d'un traitement utilisant 200 ng/mL de BMP-2 sur des CSMs humaines et des ostéoblastes matures (NHOst) pendant 6h. Ils ont ainsi observé que seules les cellules différenciées entraînent en apoptose (Hyzy *et al.*, 2012).

La BMP-2 combinée à une éponge de collagène (Medtronic) est approuvée par la FDA aux USA, notamment afin de permettre une meilleure régénération lors de fractures ouvertes du tibia (Medtronic, Infuse[®] Bone Graft fact sheet). D'autres BMPs ne sont actuellement pas utilisées d'un point de vue clinique mais pourraient présenter un intérêt thérapeutique comme les BMPs-4, -5 et -6, qui possèdent à la fois un potentiel ostéogénique mais qui peuvent également favoriser la différenciation chondrogénique (formation endochondrale du tissu osseux) (Al-Aql *et al.*, 2008; Cho *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2010).

Tableau 2.5 : Effet des BMPs sur les cellules osseuses

Famille	BMP	Concentration	Effet	Référence
BMP2/-4	BMP-2	Adénovirus	↑ activité de l'ALP dans les C2C12 (40 h)	Kang <i>et al.</i> , 2004
BMP2/-4	BMP-2	100 ng/mL	↑ activité de l'ALP dans les MC3T3-E1 (2 jours)	Guicheux <i>et al.</i> , 2003
BMP2/-4	BMP-4	Adénovirus	↑ activité de l'ALP dans les C2C12 (40 h)	Kang <i>et al.</i> , 2004
BMP-3	BMP-3	100 ng/mL Milieu contenant de la BMP-3 produite par adénovirus	↓ expression de l'ARNm codant pour Runx2, collagène de type I et OC chez les C2C12 (2 jours) ↓ activité de l'ALP dans les CSMs (48 h)	Matsumoto <i>et al.</i> , 2012 Kokabu <i>et al.</i> , 2012
BMP-5/-6/-7/-8/-8b	BMP-6	Adénovirus	↑ activité de l'ALP dans les C2C12 (40 h)	Kang <i>et al.</i> , 2004
BMP-5/-6/-7/-8/-8b	BMP-6	100 et 300 ng/mL	↑ activité de l'ALP dans les MC3T3-E1 (3 et 7 jours)	Visser <i>et al.</i> , 2012
BMP-9/-10	BMP-9	Adénovirus	↑ activité de l'ALP dans les C2C12 (40 h) ↑ activité de l'ALP dans les C3H10T1/2 (7 et 10 jours)	Kang <i>et al.</i> , 2004 Tang <i>et al.</i> , 2009
BMP-9/-10	BMP-9	42.3 ng/mL	↑ expression de l'ARNm codant pour Runx2, Osx et OC chez les MC3T3-E1 (6 jours)	Bergeron <i>et al.</i> , 2009
BMP-12/-13/-14	BMP-12	1 000 ng/mL	Ne permet pas la différenciation des C2C12 en ostéoblastes à 6 jours	Inada <i>et al.</i> , 1996
BMP-12/-13/-14	BMP-13	300 ng/mL dans un milieu ostéogénique	↓ expression de l'ARNm codant pour l'ALP et ↓ l'activité de l'ALP des CSMs humains (14 jours) comparé à un milieu ostéogénique	Shen <i>et al.</i> , 2009

De récentes études ont par ailleurs mis en évidence le fort pouvoir ostéogénique de la BMP-9 comparée à la BMP-2 (Kang *et al.*, 2004 et 2009). Une différenciation ostéogénique des cellules souches murines (C3H10T1/2) et des myoblastes (C2C12) plus importante en terme d'activité de l'ALP a été observée lorsque ces cellules sont transfectées par un adénovirus codant pour BMP-9 par rapport à celui codant pour la BMP-2 (Kang *et al.*, 2004 et 2009).

2.4.2. Les voies de signalisation des BMPs

Les récepteurs des BMPs

Pour stimuler les cellules osseuses, les BMPs interagissent sous forme de dimères avec deux récepteurs cellulaires transmembranaires Ser/Thr kinase spécifiques, de type I (ALK1, ALK2, ALK3 et ALK6) et de type II (BMPRII, ActRIIA, ActRIIB). Les BMPs ont une faible affinité pour leurs récepteurs de type I ou de type II mais établissent une interaction plus forte avec le complexe tétramérique formé par deux récepteurs de type I et deux de type II (Varga et Wrana, 2005). Les BMPs interagissent avec leurs récepteurs *via* leurs épitopes wrist et knuckle. Ainsi dans le cas de la BMP-2, une analyse cristallographique du récepteur de type I a permis de mettre en évidence l'interaction entre l'épitope wrist et le récepteur de type I ALK3 alors que l'épitope knuckle interagit avec le récepteur de type II BMPRII (Kirsch *et al.*, 2000; Knaus et Sebald, 2001, Nickel *et al.*, 2001). Les récepteurs des BMPs possèdent tous la même structure, une partie intracellulaire contenant des domaines Gly-Ser (récepteur de type I), un autre domaine intracellulaire contenant l'activité Ser/Thr kinase, un domaine transmembranaire et enfin un domaine extracellulaire contenant 8 résidus Cys participant à la structure du récepteur par la formation de ponts disulfure (Kawabata *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2006). Lorsque le dimère de BMPs interagit avec deux récepteurs de type I et deux récepteurs de type II, la phosphorylation du récepteur de type I par le récepteur de type II est induite. Cette activation des récepteurs de type I est nécessaire à la transduction du signal *via* leur action sur les protéines Smads (Sieber *et al.*, 2009).

La voie canonique des Smads

Les Smads comportent deux domaines MH1 et MH2 reliés par une région linker. Le domaine MH1 permet la liaison des Smads à l'ADN (acide désoxyribonucléique) tandis que le domaine MH2 permet la translocation des Smads activées du cytoplasme vers le noyau (Massagué *et al.*, 2005).

Il existe deux voies des Smads, la voie canonique des BMPs faisant intervenir les Smad1, Smad5 et Smad8 (Massagué *et al.*, 2005; Varga et Wrana, 2005) (Figure 2.10) et la voie des TGF- β et activines qui implique les Smad2 et Smad3 (Massagué *et al.*, 2005).

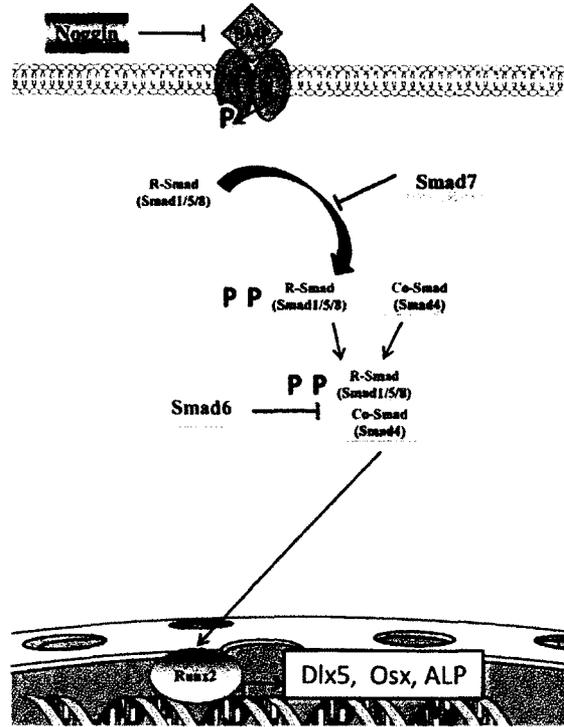


Figure 2.10 : La voie canonique des Smads (Massagué *et al.*, 2005, Varga et Wrana, 2005)

Les récepteurs de type I phosphorylés vont induire à leur tour la phosphorylation des Smad1, Smad5 et Smad8 (R-Smad : Smad régulé par les récepteurs). Cette phosphorylation bloque les interactions entre les domaines MH1 et MH2 des Smads les laissant ainsi libres d'interagir avec d'autres molécules de signalisation. Ainsi, les domaines MH2 de deux R-Smads lient Smad4 (Co-Smad : Smad partenaire commun), pour former un complexe (Wu *et al.*, 2001; Massagué *et al.*, 2005). Ce dernier va ensuite se déplacer jusqu'au noyau et interagir avec les promoteurs des gènes cibles par l'intermédiaire de la p300 et CBP (*CREB-binding protein*). L'expression des gènes codant pour les marqueurs ostéogéniques précoces, tels Dlx5, Runx2 et Osx, ainsi que l'activation de gènes plus tardifs codant pour ALP, OC ou la BSP sont ainsi induites (Massagué *et al.*, 2005).

L'activation de la voie des Smads est fortement régulée par des inhibiteurs (Gazzerro et Canalis, 2006). Ces derniers peuvent être extracellulaires (noggin, chordin, follistatine) ou intracellulaires (Smad6, Smad7) (Zimmerman *et al.*, 1996; Kamiya *et al.*, 2010a, Gazzerro et Canalis, 2006). Par exemple, les BMPs comme la BMP-2 peuvent se lier à des molécules comme le noggin ce qui inhibe leur interaction avec les récepteurs

Ser/Thr kinases (Zimmerman *et al.*, 1996). Par contre, le noggin n'a pas d'effet sur la BMP-9 (Rosen, 2006).

D'autre part, les I-Smad (Inhibiteur de Smad, Smad6 et Smad7) peuvent réguler l'activation des Smad1/5/8 à deux niveaux. Au niveau du récepteur, tout d'abord, puisque Smad7 peut bloquer la phosphorylation des Smad1/5/8 en se fixant au récepteur de type I *via* son domaine MH2 (Kamiya *et al.*, 2010a). De plus, Smad6 peut aussi empêcher la formation du complexe entre Smad4 et les Smad1/5/8. Finalement les Smad1/5/8 peuvent être adressées au protéasome *via* l'action des molécules Smurf1 et Smurf2 (*Smad ubiquitin regulatory factor*) (Zhang *et al.*, 2001). En effet, en interagissant avec Smad7, Smurf1 est capable d'induire l'ubiquitination et la dégradation du récepteur de type I des BMPs par le protéasome (Murakami *et al.*, 2003). Finalement, la GS3K- β (*glycogen synthase kinase 3 β*) est également un régulateur de la voie des Smads. L'inhibition de la GS3K- β dans des fibroblastes murins incubés en présence de la BMP-7 permet un maintien de la phosphorylation de Smad1 jusqu'à 3h contre seulement 1h en absence d'inhibiteur (Fuentelba *et al.*, 2007).

2.4.3. Les réactions croisées intégrines/BMPs

Les BMPs interagissent également avec les intégrines. Ce phénomène est plus rarement décrit dans la littérature. Cependant Lai et Cheng (2005) ont pu observer deux phénomènes. La colocalisation du récepteur de type II BMPR-II avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, mais également la nécessité de celle-ci afin de permettre l'activité du récepteur BMPR-II (Lai et Cheng, 2005). De plus, la stimulation par la BMP-2 d'ostéoblastes humains isolés d'os trabéculaire induit une augmentation de la quantité d'intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha\beta_1$ à la surface des cellules (Lai et Cheng, 2005). Jikko *et al.* (1999) ont également démontré la nécessité de l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ dans les premières étapes de différenciation des cellules 2T3 en ostéoblastes en présence de la BMP-2. Marquis *et al.* (2008) ont montré que la stimulation par un peptide dérivé de la BMP-9 (pBMP-9) (400 ng/mL) induit au niveau membranaire une augmentation de la sous-unité α_v chez les préostéoblastes MC3T3-E1 adhérents à une surface de polystyrène (PS) présentant un peptide extrait de la BSP (Ac-CGGNGEPRGDTYRAY-NH₂) ou pRGD. Seule la présence de pBMP-9 avec le peptide pRGD permet une augmentation de l'activité de l'ALP à 24h, la présence d'un peptide

mimant le collagène (CGGDGEA) interagissant avec l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ n'induit pas une telle augmentation (Marquis *et al.*, 2008).

La signalisation induite par les BMPs est également liée à celle de la FAK. En effet, l'activation de la FAK est un pré-requis afin de pouvoir observer l'activation de la voie des Smads dans les préostéoblastes MC3T3-E1 stimulés par la BMP-2 (Tamura *et al.*, 2001). L'expression d'un ARNm antisens de FAK bloque l'activité transcriptionnelle mais pas la translocation vers le noyau de Smad1 (Tamura *et al.*, 2001).

2.5. Autres voies de signalisation

2.5.1. La voie des MAPKs

La voie des MAPKs est également une voie importante dans les préostéoblastes MC3T3-E1 puisqu'elle joue un rôle dans la signalisation induite par les BMPs (Guicheux *et al.*, 2003). La voie des MAPKs se compose de trois cascades : p38, ERK1/2 et JNK (Figure 2.11). Lorsque les deux récepteurs de type I et les deux récepteurs de type II interagissent avec la BMP, XIAP (inhibiteur de l'apoptose lié au chromosome X) qui agit comme une protéine adaptatrice permet l'activation de la voie des MAPKs. XIAP recrute TAB1 (*TAK binding protein 1*) et TAK1 (*TGF- β activated kinase 1*) au niveau du récepteur de type I (Yamaguchi *et al.*, 1999). TAK1 est alors activée par phosphorylation et permet la stimulation aussi bien de ERK1/2 que de JNK ou p38 (Shim *et al.*, 2009). L'activation des 3 voies des MAPKs se fait par des intermédiaires différents. Tout d'abord, pour p38, TAK1 va activer MKK3 ou MKK6 (MAPKinase kinase) qui va ensuite phosphoryler la p38 alors que, pour obtenir la phosphorylation de ERK1/2, l'intermédiaire sera MKK1 ou MKK2. Watanabe-Takano *et al.* (2010) ont ainsi montré que, lorsque M-Ras est activé par la BMP-2, les préostéoblastes MC3T3-E1 se différencient *via* l'activation des MAPK p38 et JNK. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de p38 (SB203580) et JNK (SP600125) en présence de la BMP-2 bloquent la différenciation des préostéoblastes MC3T3-E1 en ostéoblastes matures (Guicheux *et al.*, 2003). Wang *et al.* (2007) ont également montré que cette différenciation *via* p38 se déroulait par le contrôle de l'expression d'Osx, l'inhibition de p38 menant à une diminution de l'ARNm codant pour Osx et de l'expression de la protéine dans des ostéoblastes extraits du calvaria de

souris $p53^{-/-}$. Cependant, l'effet de ERK1/2 sur la signalisation et la différenciation de préostéoblastes en ostéoblastes matures n'est pas clairement établi.

Certaines études tendent à montrer la nécessité de l'activation de ERK1/2 afin d'obtenir une différenciation des préostéoblastes murins MC3T3-E1 (Su *et al.*, 2010; Ge *et al.*, 2012).

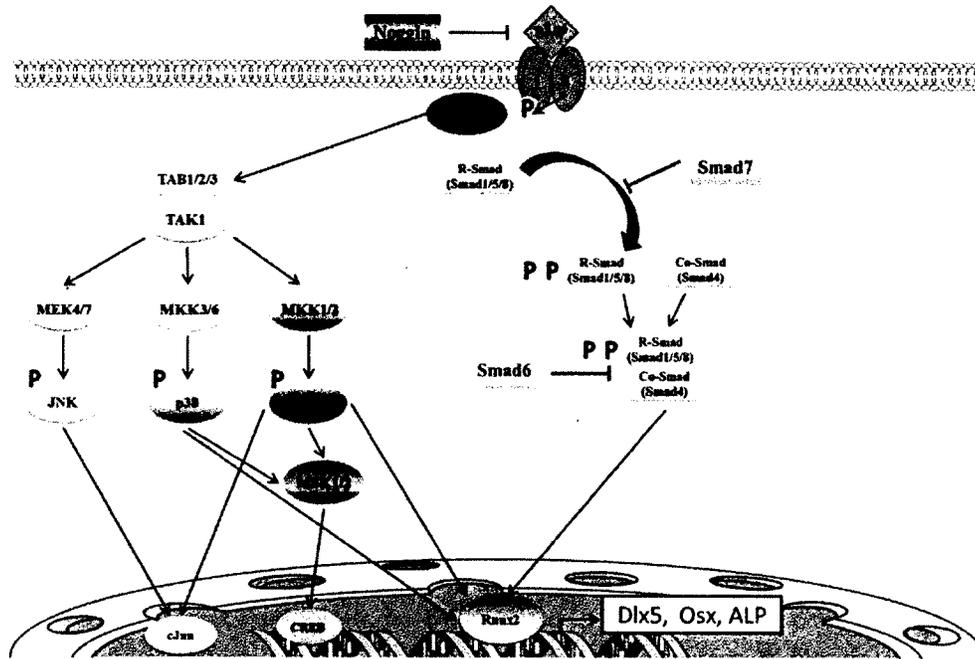


Figure 2.11 : Voie de signalisation des MAPKinases (Yamaguchi *et al.*, 1999; Shim *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2007) CREB : cyclic AMP response element binding protein

Cependant, des effets antagonistes des voies Smad/MAPK ont également été identifiés. Par exemple, TAK1 en interagissant avec le domaine MH2 des Smads peut bloquer la différenciation des cellules souches C3H10T1/2 en ostéoblastes matures (Hoffmann *et al.*, 2005). De plus, l'interaction de ERK1/2 au niveau de la région liant les domaines MH1 et MH2 des Smads va empêcher la formation du complexe R-Smad/Co-Smad et donc retenir les Smads dans le cytoplasme (Kretzschmar *et al.*, 1997; Massagué, 2003). JNK semble également avoir une influence sur la voie des Smads. En effet la phosphorylation de JNK inhiberait Smad6 permettant la phosphorylation de R-Smad (Liu *et al.*, 2011). Cependant, une autre étude présente un résultat plus mitigé puisque l'activation de JNK dans des myoblastes C2C12 induirait une surexpression de Smad6 en présence de TNF α et de BMP-2 (Mukai *et al.*, 2007).

2.5.2. La voie Wnt canonique

Une autre cascade de signalisation importante pour la différenciation et le fonctionnement des cellules osseuses est la voie des Wnts (Minear *et al.*, 2010; Kubota *et al.*, 2009; Marcellini *et al.*, 2012) (Figure 2.12).

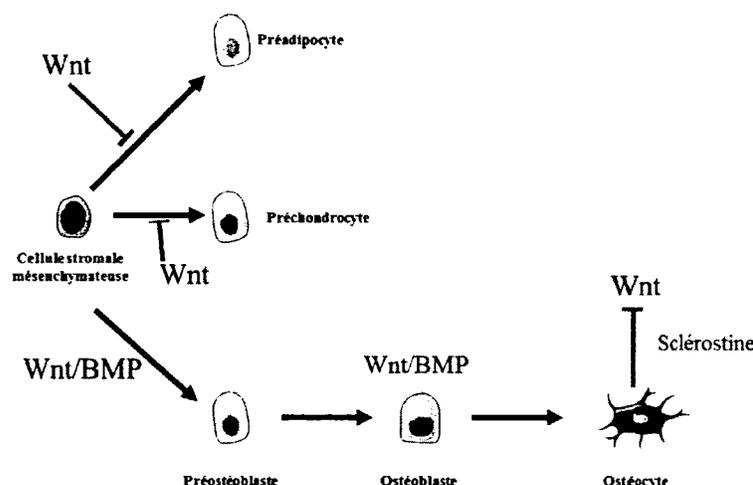


Figure 2.12 : Influence des Wnts sur la différenciation des CSMs (Kubota *et al.*, 2009; Marcellini *et al.*, 2012)

Elle se compose de trois cascades de signalisation : canonique, non canonique et la voie faisant intervenir le calcium (Amin et Vincan, 2012; Baron et Kneissel, 2013). La voie canonique sera décrite plus en détails tandis que les deux autres voies seront présentées brièvement dans la figure 2.13 (MacDonald *et al.*, 2007; Amin et Vincan, 2012; Baron et Kneissel, 2013). La voie canonique des Wnts est activée par l'interaction de Wnt1, Wnt2b, Wnt3a, Wnt7b ou Wnt8a et b sur deux récepteurs, le récepteur Frizzled et le récepteur LRP5/6 (*low density lipoprotein receptor related protein 5 and 6*) (Kubota *et al.*, 2009). Cette interaction provoque l'activation de la protéine intracellulaire Dishevelled (Dvl) qui va permettre la stabilisation de la β -caténine. L'accumulation de la β -caténine dans le cytoplasme permet sa translocation vers le noyau où elle forme un complexe avec Lef1 (*lymphoid enhancer-binding factor 1*) et Tcf (*T-cell factor*). Le complexe β -caténine/Tcf/Lef1 va interagir avec le promoteur des gènes cibles (BMP-2, Runx2, RANKL) (Dong *et al.*, 2006; Spencer *et al.*, 2006). L'activation de la Dvl empêche ainsi la formation du complexe impliquant la GS3K- β , l'axine, la caséine kinase 1 α (CK1 α) et APC (*adenomatous polyposis coli*). Celui-ci est en effet impliqué dans la phosphorylation

par la GS3K- β de la β -caténine, cette dernière, une fois phosphorylée, étant adressée au protéasome (Rubinfeld *et al.*, 1996; MacDonald *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007).

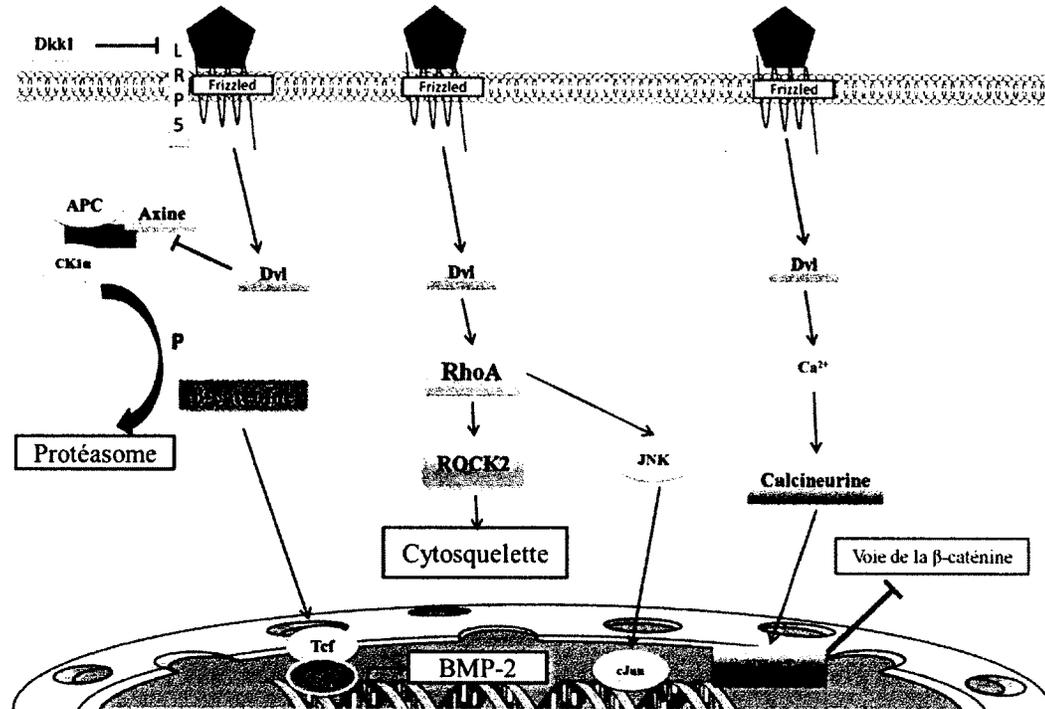


Figure 2.13 : Voie canonique et non canonique induite par la stimulation de Wnts (Amin et Vincan, 2012, Baron et Kneissel, 2013). NF-AT : *Nuclear factor of activated T*; RhoA : *Ras homolog family member A*; Rock2: *Rho kinase 2*

La voie des Wnts canonique peut être régulée par plusieurs facteurs au niveau extracellulaire. Deux types d'inhibition existent, l'une empêchant Wnt d'interagir avec son récepteur en le piégeant par des molécules comme SFRP (*secreted frizzled-related proteins*), l'autre bloquant les récepteurs Frizzled et LRP5/6 en faisant intervenir par exemple la protéine Dickkopf (Dkk) (Fedi *et al.*, 1999).

La voie des Wnt joue un rôle dans plusieurs processus de différenciation. Par exemple, Ross *et al.*, (2000) ont montré que, dans les préadipocytes murin (3T3-L1), la présence de Wnt1 (rétrovirus) bloquait la différenciation en adipocyte (marquage avec Oil Red O). De plus, Joeng *et al.* (2011) ont montré que la délétion chez la souris des récepteurs LRP5/6 et donc de la voie canonique des Wnts crée chez l'embryon des défauts dans le développement du squelette mais induit une hypertrophie chondrocytaire.

Les voie des Wnt et des BMPs s'influencent également mutuellement (Figure 2.14). Tang *et al.* (2009) ont ainsi démontré que des C3H10T1/2 transfectées par un adénovirus codant pour la BMP-9 présentait une activation de la voie canonique des Wnts après 36 h et une augmentation de l'activité de leur ALP après 7 jours. De plus, la stimulation par Wnt3a de préostéoblastes MC3T3-E1 permet l'activation de la synthèse de BMP-2 (Cho *et al.*, 2012). Zhang *et al.* (2009b) ont montré que la BMP-2 pouvait également réguler la voie des Wnts au niveau de l'expression du récepteur LRP5/6 et en inhibant l'E3 ligase qui intervient dans la dégradation de la β -caténine. Sato *et al.* (2009) ont aussi observé un accroissement de la synthèse d'OPG dans les préostéoblastes MC3T3-E1 en présence de Wnt3a et de BMP-2 montrant ainsi l'importance de la voie des Wnts dans ces réactions croisées avec la BMP-2 sur l'ostéoclastogénèse. En effet, une augmentation de la synthèse en OPG peut induire une diminution de la différenciation des précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes matures (Kusumi *et al.*, 2005; Stolina *et al.*, 2009).

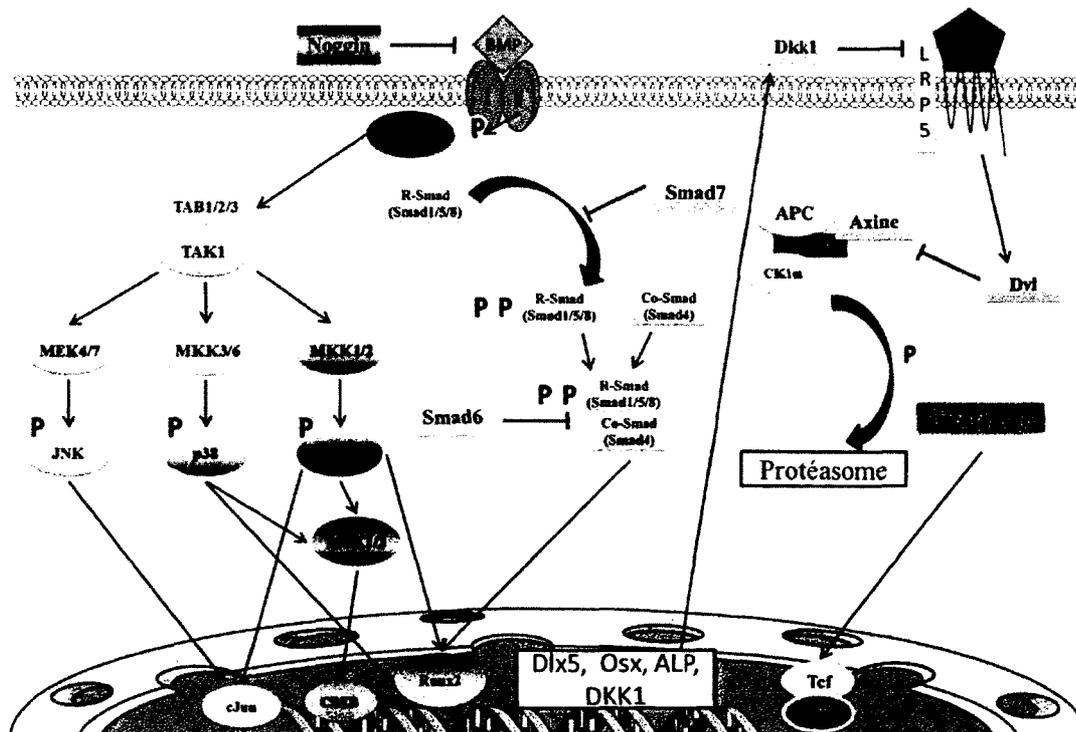


Figure 2.14 : Réaction croisée BMPs/voie canonique des Wnts (Varga et Wrana, 2005; Amin et Vincan, 2012)

En résumé, les phénomènes d'adhésion *via* entre autres les interactions intégrines-protéines de l'ECM et de différenciation cellulaires sont intimement liées. En effet, le premier contact d'une cellule avec l'ECM va définir son aptitude à adhérer, survivre et se différencier en répondant aux cytokines et facteurs de croissance dont les BMPs et Wnt. De plus, les BMPs et les Wnts gouvernent le fonctionnement cellulaire et donc la réparation osseuse. Ainsi, le développement de matériaux biomimétiques prenant en compte cet aspect adhésion et capacité de réponse des cellules adhérentes aux facteurs de croissance semble prometteur pour des applications osseuses. Il convient néanmoins de décrire dans un premier temps le type de matériau utilisé en application osseuse et qui peut être sélectionné pour la fonctionnalisation par des peptides d'adhésion.

2.6. Choix du matériau

2.6.1. Les matériaux en régénération osseuse

Il existe plusieurs types de matériaux utilisés dans le domaine osseux ayant chacun leurs avantages et leurs limitations (Tableau 2.6.). Il existe ainsi trois grandes familles de matériaux, les matériaux inorganiques, les polymères (naturels et synthétiques) et finalement les matériaux composites. Tous ces biomatériaux ont en commun la recherche d'une passivité au niveau de la réponse immunitaire afin de ne pas induire de complications, l'absence de toxicité et d'effet cancérogène (Ratner *et al.*, 2004).

Tableau 2.6 : Les matériaux en application osseuse, avantages et limitations (adapté de Marquis *et al.*, 2009)

Matériaux	Avantages	Désavantages	Exemple
Inorganiques	Biocompatible, ostéoconductif, ostéointégratif, similaire à l'os, résorbable ou non résorbable, Permet l'adsorption des BMPs	Ostéoinduction limitée, cassant, difficulté à définir le 3D	- Corail, verre bio actif, HAP - Métaux : Titane
Polymères naturels	Biocompatible, ostéoconductif, ostéointégratif Permet l'adsorption des BMPs	- Ostéoinduction limitée - Transmission d'agent pathogène - Difficulté de stérilisation	- Protéines : Collagène - GAG : chitosan
Polymères synthétiques	- Ostéoconductif, ostéointégratif - Fabrication reproductible - Stérilisable	- Ostéoinduction limitée - Reconnaissance cellulaire parfois difficile - Possible dénaturation des protéines adsorbées	PCL, PLA, etc.
Matériaux composites	Combine les avantages des différents matériaux sélectionnés	Mélange des matériaux parfois difficile	PLA-chitosan, PLA-polyéthylène glycol-HAP...

PCL : polycaprolactone; PEG : Polyéthylène glycol; PLA : Polylactide

Les derniers développements dans le domaine des matériaux en application osseuse se concentrent sur les matériaux cherchant à mimer le vivant, les matériaux biomimétiques. Afin d'avoir des propriétés similaires à celles du « standard en or », les autogreffes, ces nouveaux biomatériaux doivent permettre non seulement une bonne ostéoconduction mais également une bonne ostéoinduction (Ratner *et al.*, 2004). Dans certains cas, le remplacement total de l'implant par une matrice nouvellement formée est également requis.

Dans ce cas, le matériau doit être biodégradable et être résorbé dans un temps raisonnable sans induire de réaction de la part de l'organisme. Un grand engouement pour les polymères synthétiques dans la conception des matériaux biomimétiques a ainsi été observé en raison de leur procédé de synthèse plus reproductible et leur biodégradation contrôlée (Middleton et Tipton, 2000; Chen *et al.*, 2007; Zhou et Xanthos, 2008; Ajami-Henriquez *et al.*, 2008). Les polymères sont caractérisés par différents paramètres comme la formule chimique du monomère, la longueur de chaîne, la cristallinité, la température de transition vitreuse, la température de fusion (Tableau 2.7). L'ensemble de ces paramètres va jouer un rôle sur la compatibilité, la dégradation et les propriétés mécaniques du polymère.

Tableau 2.7 : Propriétés de différents polymères synthétiques

Matériau	Structure	Propriétés physiques	Dégradabilité / tolérance de l'organisme	Effet sur les cellules osseuses	Réf
Polyméthacrylate de méthyle (PMMA)		$T_f = 130-140^\circ\text{C}$		Utilisé dans les ciments (Cortoss®)	
PLA		$T_f = 173-178^\circ\text{C}$ Contrôle de la cristallinité ~35% (stéréochimie) ↑ Cristallinité, ↑ propriétés mécaniques	↑ Cristallinité => ↓ Dégradation - Produits de dégradation acide - Dégradation 6-12 mois	Utilisé dans le cadre des fils de suture (Dexon®) Permet la différenciation des CSMs de rat en ostéoblastes Fixsorb® Neofix®	Gugala et Gogolewski, 2004
Poly lactide-co-glycolide (PLGA)		Contrôle de la vitesse de dégradation par l'intermédiaire des ratios de monomères	Temps de demi-vie de 1 à 6 mois; dégradation maximum au ratio 50/50	Utilisé comme suture (Polysorb™)	Middleton et Tipton, 2000
PCL		$T_f = 60-63^\circ\text{C}$ Dégradation plus lente que le PLA Cristallinité 30 à 60%	Dégradation > 24 mois	Osteoplug™ Osteomesh™	

Dans ce projet, le choix s'est porté sur le PCL, ce matériau ayant une résorption lente, limitant les réponses inflammatoires et permettant un contrôle de la mise en forme (Savarino *et al.*, 2007; Choong *et al.*, 2012). En effet, la dégradation lente *in vivo* (lapin blanc de Nouvelle-Zélande) d'une structure en 3D en PCL comparé à la même structure réalisée en PLGA permet la synthèse d'une matrice osseuse plus dense (Park *et al.*, 2012a). De plus, l'utilisation d'implants de PCL montre *in vivo* chez le cochon une régénération du

plancher orbitale après 3 mois (Rohner *et al.*, 2003). Schantz *et al.* (2006) ont également montré la faisabilité de la reconstruction du tissu osseux par l'utilisation d'implants formés de PCL dans le cadre d'une étude clinique pilote visant à combler une perte osseuse après trépanation. Ainsi, plus de 200 patients ont reçu cette chirurgie entre 2002 et 2007 (Hutmacher *et al.*, 2007). De plus, des substituts osseux à base de PCL sont actuellement commercialisés sous les appellations osteoplugTM et osteomeshTM pour des applications de reconstruction de la crête iliac et du plancher orbital (www.osteopore.com).

2.6.2. Le polycaprolactone

Le PCL est un polyester obtenu par la polymérisation d'un macrocycle d'éther (lactone) (Figure 2.15). Le PCL peut aussi être synthétisé par un procédé dit vert en utilisant des lipases comme celles de *Candida Antartica* (Kumar et Gross, 2000).

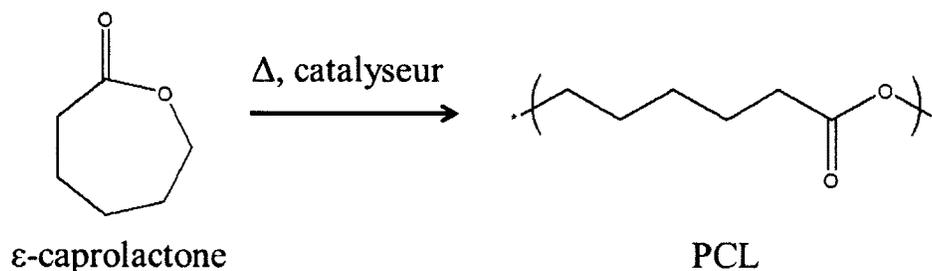


Figure 2.15 : Structure du PCL (Labet et Thielemans, 2009)

Le PCL est un polymère linéaire ne comportant pas de chaîne latérale (Zenkiewicz *et al.*, 2013). C'est un polymère semi-cristallin pouvant posséder une cristallinité de 69 %. Ce fort pourcentage de cristallinité permet une protection de la fonction ester vis-à-vis de l'hydrolyse menant ainsi à un temps de dégradation plus long (Faÿ *et al.*, 2006). Le pourcentage de cristallinité du PCL influence également la prolifération des préostéoblastes humains (cellules mésenchymateuses humaines embryonnaires du palais, CRL-1486) (Cui et Sinko, 2012). Ainsi, la haute cristallinité diminue la prolifération comparé à un matériau moins cristallin (Cui et Sinko, 2012). Le PCL possède une température de fusion de 60°C avec une température de transition vitreuse de -60°C et se trouve être insoluble dans les solvants tels que l'alcool et l'eau, ce qui en fait un bon candidat pour des utilisations biomédicales comme dans le cadre des sutures (copolymère) ou de la reconstruction des ligaments (Artelon®) (Bell *et al.*, 2011) (Tableau 2.8.). Le PCL

est un matériau à caractère hydrophobe comme le montre la mesure de l'angle de contact (60°) (Ng *et al.*, 2001).

Tableau 2.8 : Utilisation commerciale du PCL (Bell *et al.*, 2011; Klopp *et al.*, 2008; Osteopore™)

Matériau	Nom commercial	Application
PCL	Osteomesh™	Chirurgie craniofaciale (ex : réparation du plancher orbital, comblement de perte osseuse)
PCL	Osteoplug™	Chirurgie de comblement d'un trou de trépanation
PCL (polyuréthane)	Artelon®	Déchirure du ligament Espasseur dans le traitement de l'ostéoarthrite
PCL-PLA	Mesofol	Film bloquant l'adhésion des tissus
PCL-Polyglycolide	Ethicon : Monocryl™	Fil de suture pour les tissus mous

Les différentes propriétés (mécaniques, dégradation) du PCL sont liées à sa masse molaire et à sa cristallinité. En effet la longueur de chaîne influence particulièrement les propriétés mécaniques (Yeh *et al.*, 2011). Les valeurs moyennes en terme de densité vont de 1,07 à 1,2 g/cm³ et le module de Young varie de 0,21 à 0,44 GPa (Labet et Thielemans, 2009).

De plus, le PCL se dégrade de façon lente *in vivo* avec une perte de masse de l'ordre de 3 % après 6 mois (Lam *et al.*, 2009). Le PCL se dégrade plus lentement que le PLA même quand celui-ci possède une masse molaire plus importante (156 vs 69 kDa) avec un temps de 6 mois pour le PLA et supérieur à 24 mois pour le PCL (Zenkiewicz *et al.*, 2013; Middleton et Tipton, 2000). Le facteur déterminant pour la dégradation est la pénétration de l'eau au sein du matériau qui est l'élément clé pour la cinétique de dégradation (Li et McCarthy, 1999; Middleton et Tipton, 2000). Ainsi l'hydrophobicité du matériau, la longueur de chaîne et la cristallinité sont des paramètres diminuant la vitesse de la dégradation de ce polymère en prévenant l'adsorption des molécules d'eau. L'apparition de chaînes courtes accélère la dégradation du PCL. En effet, les matériaux à base de PCL ayant des chaînes courtes se dégradent le plus rapidement (Hakkarainen et Albertsson 2002).

2.6.3. Interaction du polycaprolactone avec les cellules

Les interactions entre le PCL et les cellules sont cependant limitées. L'hydrophobicité de sa surface ainsi que l'absence de groupements réactifs tels que des fonctions amine ne sont pas ou peu favorables à une colonisation du polymère par les cellules (Ng *et al.*, 2001; Marletta *et al.*, 2005). Cependant une hydrolyse du PCL avec une solution d'hydroxyde de sodium, en faisant apparaître au sein du matériau des fonctions acides carboxyliques et hydroxyles, diminue la valeur de l'angle de contact à 20° (Ng *et al.*, 2001). Cette simple modification chimique permet alors un meilleur attachement des fibroblastes humains issus du derme à la surface du PCL (Ng *et al.*, 2001). L'irradiation du PCL peut également augmenter le nombre d'ostéoblastes issus de la hanche sur la surface (Marletta *et al.*, 2005) (Tableau 2.9).

Tableau 2.9 : PCL en application osseuse

Matériau	Mise en forme	In vitro/In vivo	Effet/Utilisation	Référence
PCL	Films hydrolysés + dépôt d'une couche d'apatite	In vitro (hCSM issues de la hanche)	↑ activité de l'ALP après 12 jours	Choong <i>et al.</i> , 2012
PCL/PCL-PLA	Films	In vitro (cellules extraites du calvaria de rat Sprague Dawley)	Permet la prolifération des cellules à 96 h ↑ de la prolifération par le contrôle de l'insertion de PLA dans le PCL	Ajami-Henriquez <i>et al.</i> , 2008
PCL	Echafaudage 3D (Pores 100-300 µm)	In vivo (Lapin New Zealand)	- Faible ostéointégration - Utilisation de cellules souches autologues permet la formation de nouveau tissu osseux	Savarino <i>et al.</i> , 2007
PCL-Tri calcium phosphate	Echafaudage 3D (pores 350-500 µm)	In vivo (mouton)	Régénération lente d'une fracture du tibia comparée à l'autogreffe	Reichert <i>et al.</i> , 2011

Afin de permettre une meilleure interaction entre les cellules et le PCL il est possible de fonctionnaliser le polymère par des peptides d'adhésion extraits des protéines

de l'ECM dont ceux comportant une séquence RGD. Le greffage peut se faire suivant différentes voies, l'hydrolyse ou l'aminolyse (Figure 2.16).

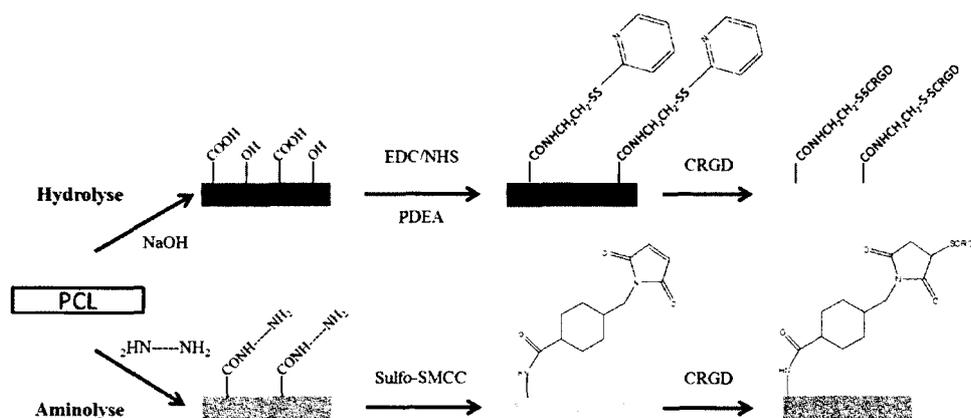


Figure 2.16 : Schéma de la fonctionnalisation par hydrolyse ou aminolyse d'un film de PCL. Sulfo-SMCC : sulfosuccinimidyl 4-(N-maléimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate)

L'hydrolyse utilise la réactivité de l'hydroxyde de sodium sur la liaison ester permettant la formation de fonctions acides carboxyliques (Sun et Önnéby, 2006). Le procédé d'aminolyse permet l'apparition de fonctions amine sur la surface par l'utilisation d'hexane diamine qui réagit avec la fonction ester pour former une liaison amide (Zhang et Hollister, 2009). Ensuite, les molécules actives biologiquement dont les peptides d'adhésion RGD peuvent être greffées sur la surface (Tableau 2.10) (Karakecili *et al.*, 2007). Par contre, peu d'équipes de recherche utilisent des peptides négatifs comme GYDGR pour valider les résultats obtenus avec les peptides d'adhésion (Gabriel *et al.*, 2006; Causa *et al.*, 2010) (Tableau 2.10).

Cependant, l'introduction d'espèces réactives à la surface du PCL comme les fonctions acides carboxyliques ou amines, en modifiant son hydrophilicité de surface et sa charge, pourrait favoriser l'adsorption non spécifique des protéines du milieu physiologique (*in vivo*) ou du sérum (*in vitro*) (Michael *et al.*, 2003). Michael *et al.* (2003) ont ainsi montré que l'hydrophobicité d'une surface d'or modulée par différents groupes chimiques (-CH₃, -OH, -NH₂ et -COOH) est un facteur dirigeant l'adsorption de fragments de la fibronectine (FNIII₇₋₁₀). Plus une surface est hydrophobe plus elle adsorbe de peptides (Michael *et al.*, 2003). Cependant, cette adsorption s'accompagne d'une dénaturation des peptides, des cellules NIH-3T3 adhérant de façon plus importante sur les surfaces ayant un caractère hydrophile et adsorbant les fragments de fibronectine sans changement de

conformation (Michael *et al.*, 2003). Les capacités d'interaction entre le matériau et les cellules permises par le greffage de peptides peuvent être complètement perdues par cette adsorption non spécifique de protéines (Thakurta et Subramanian, 2011). Il est alors nécessaire d'utiliser un intermédiaire sur la surface afin de prévenir cette adsorption non spécifique. L'intermédiaire le plus couramment utilisé pour résoudre ce problème est le polyéthylène glycol (PEG) (Michel *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2013).

Plusieurs peptides issus de protéines de l'ECM ont été sélectionnés pour concevoir des matériaux biomimétiques (Ruoslahti et Pierschbacher, 1987; Rezanian et Healy, 1999a, 1999b; Reyes *et al.*, 2007). Par exemple, les peptides extraits du collagène et reconnus par l'intégrine $\alpha_2\beta_1$, comme le peptide GFOGER, adsorbés sur une surface de titane, permettent *in vitro* une différenciation des CSMs de rat (Wistar) en ostéoblastes (expression de l'ARNm codant pour OC, augmentation de l'activité de l'ALP) (Reyes *et al.*, 2007). Une meilleure formation osseuse après 4 et 12 semaines est également observée *in vivo* chez le rat Lewis pour une surface de PCL ayant adsorbé le peptide GFOGER (Wojtowicz *et al.*, 2010). D'autre part, la fonctionnalisation du PCL par le peptide RGD permet une augmentation du nombre d'ostéoblastes humains (hanche) présents sur la surface à 24 et 42h comparativement au PCL seul (Marletta *et al.*, 2005).

Afin de cibler un seul type d'intégrines de façon spécifique à partir de la séquence RGD qui est présente dans de nombreuses protéines d'adhésion, il s'avère nécessaire d'utiliser des séquences d'acides aminés plus longues (Ruoslahti et Pierschbacher, 1987). Par exemple, le peptide Ac-CGGNGEPRGDTYRAY-NH₂ extrait de la BSP est reconnu spécifiquement par l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Rezanian et Healy, 1999b). Une fois le peptide greffé sur une surface de titane en combinaison avec un polymère de poly(acrylamide-co-éthylène glycol/acide acrylique) il est alors possible d'observer une augmentation après 4 jours de la prolifération d'ostéoblastes issus du calvaria de rat pouvant adhérer sur la surface (Barber *et al.*, 2006).

Tableau 2.10 : Fonctionnalisation du PCL par des peptides comportant RGD

Matériaux	Peptide	Méthode de greffage	Résultat cellulaire	Référence
PCL-PEG	GRGDS	UV + dérivé de N-hydroxysuccinimide (NHS)	Pas de test cellulaire	Pourcelle <i>et al.</i> , 2007
PCL	GRGDS (contrôle négatif DGR)	Amine	↑ le nombre de cellules endothéliales du prépuce présentes sur la surface après 4 h	Gabriel <i>et al.</i> , 2006
PCL	RGD	Irradiation par Ar ⁺	↑ le nombre d'ostéoblastes (issus de la hanche de patient) adhérant à 24 et 72 h	Marletta <i>et al.</i> , 2005 Amato <i>et al.</i> , 2007
PCL	RGDC	Amine	Permet l'organisation du cytosquelette de CSMs de rat (4 h), ↑ la viabilité (12 h) Permet la prolifération de CSMs de rat (7 jours)	Zhang et Hollister, 2009
PCL	GRGDY (Contrôle négatif GYDGR)	Amine	↑ Organisation du cytosquelette des fibroblastes (NIH3T3) à 24h comparée au PCL seul, PCL-NH ₂ ou au contrôle	Causa <i>et al.</i> , 2010
PCL	GRGDSPC	Acide carboxylique	Pas de test cellulaire	Sun et Önnby, 2006
PCL (<i>electro-spinning</i>)	RGD-Peptide EAK	Adsorption	↑ le nombre d'ostéoblastes humains à 2 h ↑ la quantité de calcium déposé dans ECM après 7 jours par rapport au PCL seul	Danesin <i>et al.</i> , 2012
PCL (3D)	GRGDS	Amine	↑ le nombre d'ostéoblastes humains adhérents à 24h	Gabriel <i>et al.</i> , 2012
PCL (3D)	GRGDY	Amine	↑ Survie de fibroblastes NIH-3T3 après 5 jours	Gloria <i>et al.</i> , 2012

Cependant, l'impact de la fonctionnalisation de polymères par des peptides d'adhésion ciblant certaines intégrines spécifiques sur la capacité de réponses des cellules osseuses à leur environnement est peu connu. Lai et Cheng (2005) ont en effet montré que la sous-unité intégrine $\alpha_v\beta$ était nécessaire pour que le signal induit par la BMP-2 soit effectif. L'utilisation d'un anticorps bloquant dirigé contre l' $\alpha_v\beta$ (L230) sur des ostéoblastes humains empêche la minéralisation de la matrice induite par 100 ng/mL de BMP-2 (Lai et Cheng, 2005). Marquis *et al.* (2008) ont également démontré que seule l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ciblée par des peptides pRGD pouvait favoriser la réponse des préostéoblastes murins à un peptide dérivé de la BMP-9 (pBMP-9).

Dans ce projet de doctorat, la capacité de fonctionnalisation, le temps de dégradation ainsi que l'utilisation commerciale actuelle au niveau de chirurgies craniofaciale et de comblement de trous de trépanation ont permis d'identifier le PCL comme étant un bon candidat pour un projet à application osseuse. De plus, la sélection du peptide pRGD dérivé de la sialoprotéine osseuse spécifiquement reconnu par l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ pour fonctionnaliser le PCL est aussi justifiée par l'existence d'interactions croisées entre les intégrines $\alpha_v\beta$ et la BMP-2 ou peptide dérivé de la BMP-9 (Lai et Cheng, 2005; Marquis *et al.*, 2008). Afin de s'assurer des réponses cellulaires induites par le pRGD-PCL, un peptide négatif pRGE est également sélectionné pour fonctionnaliser le PCL. En effet, le remplacement de l'acide aspartique D par l'acide glutamique E empêche la reconnaissance du pRGE par les intégrines (Pierschbacher et Ruoslahti, 1984b; Hersel *et al.*, 2003). De plus, la sélection de la BMP-9 pour favoriser la différenciation ostéoblastique se justifie par son pouvoir ostéogénique supérieur à celui de la BMP-2, protéine actuellement utilisée en clinique qui servira de référence dans cette étude (Kang *et al.*, 2004 et 2009).

L'originalité de ce projet de doctorat réside donc dans l'étude de l'effet de la fonctionnalisation du PCL par des peptides d'adhésion, ciblant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, sur la capacité des préostéoblastes murins MC3T3-E1 à répondre à la BMP-2 et/ou à la BMP-9, en termes de signalisations intracellulaires à court terme (voies des Smad, MAPK et Wnt canonique) et de comportement cellulaire à plus long terme (survie, différenciation). Dans un premier temps, il s'est avéré important de réaliser et de valider la méthode de fonctionnalisation de films de PCL par des peptides d'adhésion pRGD et de déterminer la réponse cellulaire induite par cette fonctionnalisation par rapport au contrôle négatif pRGE. Dans un second temps, l'influence d'une telle fonctionnalisation sur la signalisation de la

BMP-2 ainsi que de la BMP-9 dans les préostéoblastes MC3T3-E1 adhérant aux films de PCL a pu être évaluée.

3. CHAPITRE 3

EFFET DU POLYCAPROLACTONE FONCTIONNALISÉ SUR LE COMPORTEMENT DE PRÉOSTÉOBLASTES MURINS

Titre original : Effect of functionalized polycaprolactone on the behaviour of murine preosteoblasts

Auteurs et affiliations:

O Drevelle, M.Sc, Etudiant au doctorat, Cell-Biomaterials Biohybrid Systems, Université de Sherbrooke, Department of Chemical Engineering and Biotechnological Engineering.

E Bergeron, PhD, Ing. Jr., Cell-Biomaterials Biohybrid Systems, Université de Sherbrooke, Department of Chemical Engineering and Biotechnological Engineering.

H Senta, PhD, Cell-Biomaterials Biohybrid Systems, Université de Sherbrooke, Department of Chemical Engineering and Biotechnological Engineering.

MA Lauzon Bc, Etudiant à la maîtrise, Cell-Biomaterials Biohybrid Systems, Université de Sherbrooke, Department of Chemical Engineering and Biotechnological Engineering.

S Roux, MD, PhD, Centre de Recherche Clinique Etienne-Lebel, Université de Sherbrooke.

G Grenier, PhD, Professeur, Centre de Recherche Clinique Etienne-Lebel, Université de Sherbrooke; Centre de Recherche sur le vieillissement, Université de Sherbrooke; Department of Orthopaedic Surgery, Université de Sherbrooke.

N Fauchoux, PhD, Professeur, Cell-Biomaterials Biohybrid Systems, Université de Sherbrooke, Department of Chemical Engineering and Biotechnological Engineering

Date d'acceptation : Mai 2010

Etat de l'acceptation : Publié

Revue : Biomaterials

Contribution au document:

Cet article contribue à la thèse en présentant :

- La fonctionnalisation de films de PCL par un peptide pRGD ou pRGE
- Les propriétés de surface des films PCL en termes de rugosité, épaisseur, groupements fonctionnels et hydrophilicité
- La capacité d'adsorption des protéines du sérum par les films PCL
- L'organisation du cytosquelette de préostéoblastes murins sur les films PCL avec et sans fonctionnalisation et en présence ou en absence de sérum
- L'activité de la FAK dans les préostéoblastes MC3T3-E1 adhérant au PCL-pRGD
- La réponse des préostéoblastes MC3T3-E1 à la BMP-2 *via* l'activation de la voie des Smads

3.1. Résumé français

L'efficacité des biomatériaux utilisés dans la réparation des os dépend grandement de leur capacité à interagir avec les cellules osseuses. Ainsi, nous avons fonctionnalisé des films de polycaprolactone (PCL) par des peptides dérivés de la sialoprotéine osseuse contenant la séquence RGD (pRGD), afin d'accroître leur interaction avec des préostéoblastes murins MC3T3-E1 et favoriser la réponse cellulaire à la protéine recombinante humaine BMP-2 (rhBMP-2). Le peptide RGE (pRGE) a été utilisé comme contrôle négatif. Les films PCL ont tout d'abord été hydrolysés avec de l'hydroxyde de sodium (NaOH) et les fonctions acide carboxylique ont ensuite été activées afin de permettre le greffage du peptide. Le traitement alcalin a augmenté l'hydrophilicité du PCL sans modifier de façon significative sa rugosité. L'immobilisation du peptide a ensuite été vérifiée par spectrométrie photoélectronique X (XPS). Les films PCL hydrolysés (Hydro PCL) ont adsorbé la fibronectine et la vitronectine du sérum après 1 h et ont empêché l'étalement des préostéoblastes MC3T3-E1, alors que les films fonctionnalisés par pRGD ou pRGE l'ont permis. Par contre, les préostéoblastes MC3T3-E1 incubés sans sérum pendant 1 h sur pRGD se sont étalés de façon plus importante que ceux sur Hydro PCL ou pRGE. Seules les cellules sur pRGD ont organisé leur cytosquelette, présenté une FAK phosphorylée sur Y³⁹⁷ et ont répondu à la rhBMP-2 par l'activation de la voie des Smads.

Ainsi, le PCL-pRGD pourrait être utilisé afin de favoriser l'organisation du cytosquelette des cellules osseuses et leur réponse à la rhBMP-2.

3.2. Abstract

The efficiency of biomaterials used in bone repair depends greatly on their ability to interact with bone cells. Hence, we have functionalized polycaprolactone (PCL) films by peptides derived from the bone sialoprotein containing RGD sequence (pRGD), to increase their ability to interact with murine MC3T3-E1 preosteoblasts, and favour cell response to recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). RGE peptides (pRGE) were used as negative controls. The PCL films were hydrolyzed with NaOH and then carboxylic acid groups were activated to allow chemisorption of the peptides. Alkaline treatment increased the hydrophilicity of PCL films without significantly change their roughness. Peptide immobilization on PCL was checked by X-ray photoelectron spectroscopy. Hydrolyzed PCL films (Hydro PCL), which adsorbed fibronectin and vitronectin from serum after 1 h incubation, prevented the spreading of MC3T3-E1 preosteoblasts, while films bearing pRGD or pRGE did not. In contrast, MC3T3-E1 preosteoblasts attached to pRGD and incubated for 1 h in serum-free medium spread better than cells on Hydro PCL or pRGE. Only cells on pRGD had organized cytoskeleton, phosphorylated focal adhesion kinase on Y³⁹⁷ and responded to rhBMP-2 by activating Smad pathway. Thus, pRGD PCL may be used to favour bone cell cytoskeletal organization and response to rhBMP-2.

3.3. Introduction

Biomaterials are widely used in the repair of bone tissue but their efficiency depends greatly on their ability to interact with bone cells (Puleo and Nancy, 1999; Marquis *et al.*, 2009). Specific adhesion peptides, that mimic the proteins of the extracellular matrix (ECM), have therefore been developed to favour the adhesion of cells to biomaterials (Pierschbacher and Ruoslathi, 1984a). Peptides used to functionalize biomaterials are less expensive than ECM and are more readily available and purer (Rezania and Healy, 1999a; Shin *et al.*, 2004; Barber *et al.*, 2006). The tripeptide Arg-Gly-Asp (RGD), which is present in proteins like fibronectin, vitronectin and bone sialoprotein is the most commonly used because it interacts with integrins, heterodimeric ab transmembrane receptors (Hersel

et al., 2003). For example, Ac-CGGNGEPRGDTYRAY-NH₂ peptides (pRGD) derived from bone sialoprotein are recognized by α_v integrin subunits and $\alpha_v\beta_3$ integrins (Rezania and Healy, 1999a; Marquis *et al.*, 2008). Several studies have demonstrated that RGD peptides grafted onto materials such as quartz, titanium, or hydroxyapatite can increase the adhesion of human osteoblastic cells and the differentiation of rat calvarial osteoblasts *in vitro* and can stimulate bone formation *in vivo* (Rezania and Healy, 1999a; Ferris *et al.*, 1999, Hennessy *et al.*, 2008).

Polycaprolactone (PCL) is a semi-crystalline aliphatic polyester, that has been used recently in tissue engineering and bone repair applications because of its properties of biocompatibility and slow degradation (Liao *et al.*, 2008). However, cells attach poorly to PCL, so that active molecules such as RGD must be grafted onto it to improve cell-PCL interactions (Marletta *et al.*, 2005; Zhang and Hollister, 2009; Karakecili *et al.*, 2007). Karakecili *et al.* have demonstrated that RGD tripeptides favour the initial attachment of murine L929 fibroblasts to a PCL film after incubation for 2 h or 4 h in the presence of 10 % foetal bovine serum (FBS) (Karakecili *et al.*, 2007).

However, little is known about the influence of such adhesion peptides on the ability of bone cells to respond to growth factors such as the bone morphogenetic proteins (BMPs) or their derived peptides (Marquis *et al.*, 2008; He *et al.*, 2008). BMPs play a crucial role in the differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts *in vitro* (Lavery *et al.*, 2008). Recombinant human BMP-2 (rhBMP-2) is the BMP most frequently used in clinical bone healing studies (Burkus *et al.*, 2004). We have recently shown that adhesion peptides adsorbed onto polystyrene (PS) greatly impair the response of MC3T3-E1 preosteoblasts to a peptide derived from BMP-9 (pBMP-9) (Marquis *et al.*, 2008). Early cell differentiation in the presence of the pBMP-9 only occurs in MC3T3-E1 preosteoblasts attached to pRGD coated PS. A better understanding of the crosstalk between adhesion peptides and BMP is therefore required in order to develop new biomimetic materials that allow BMP signalling and promote bone formation.

We therefore functionalized PCL films with pRGD or pRGE (negative control) to verify their influence on cell cytoskeleton organization and response to rhBMP-2. We first characterized the PCL films by scanning electron microscopy (SEM), atomic force microscopy (AFM), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and water contact angle measurements. We also determined their capacity to non-specifically adsorb serum

proteins, especially fibronectin and vitronectin. We then determined the influence of functionalized PCL on the cytoskeleton organization of MC3T3-E1 preosteoblasts, particularly their ability to form focal adhesion points and actin stress fibres. We also determined the cell spreading area and analysed the phosphorylation of focal adhesion kinase (FAK). Lastly, we examined the responses of cells on pRGD to rhBMP-2 by determining Smad pathway activation.

3.4. Materials and methods

3.4.1. Materials

The pRGD peptide (Ac-CGGNGEPRGDTYRAY-NH₂) derived from the bone sialoprotein and its negative control pRGE (Ac-CGGNGEPRGETYRAY-NH₂) were synthesized by Celtek Peptides (Nashville, TN, USA) with a final purity of 98 %. Recombinant carrier-free human BMP-2, synthesized in *Escherichia coli*, was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA).

3.4.2. Preparation of PCL films

PCL pellets (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were dissolved in (5 % w/v) 1,4-dioxane (Fluka, St. Louis, MO, USA) for 6 h at room temperature under gentle stirring. Glass Petri dishes (19.62 cm²; Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) were flooded with this PCL solution (0.1 mL/cm²) and the solvent was evaporated at 80 °C overnight. The PCL films were functionalized by a modification of the method of Sun and Önnby (Sun and Önnby, 2006). Briefly, the films were hydrolyzed (0.25 mL/cm²) by incubation with 0.5 mol/L NaOH (Sigma) for 2 h at room temperature under gentle agitation, washed once with distilled water for 5 min and then flooded with 0.01 mol/L HCl (Fisher Scientific) for 30 min at room temperature. The films were again washed with distilled water for 5 min and functionalized with 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) (0.904 mg/mL, Fluka)/N-hydroxysuccinimide (NHS) (0.143 mg/mL, Fluka) for 20 min at room temperature. The films were then rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) (0.15 mL/cm²) and covered with 2-(2-pyridinyldithio) ethaneamine hydrochloride (PDEA) (0.15 mg/mL, Biacore AB, Uppsala, Sweden) for 1 h at room temperature. The films were washed once more with PBS (0.15 mL/cm²) for 5 min and placed in pRGD or pRGE solution (0.33 mg/mL, 0.15 mL/cm²) for 15 min at room temperature.

3.4.3. Characterization of PCL films

SEM

The films were examined in a Hitachi S-3000N SEM with an accelerating voltage of 5 kV at a magnification of 1000 for surface analysis and at 700 to measure the thickness.

AFM

The surface topography of the PCL films was measured with an AFM (Nanoscope III, Veeco Instruments Inc., Santa Barbara, CA, USA) in contact mode in air. Data were acquired on 5 μm X 5 μm squares. Images were processed using Nanoscope[®] III software V5.31r1 (Veeco Instruments Inc.).

XPS

The XPS analyses were performed with an ESCALAB 3 MKII (Thermo VG scientific, East Grinstead, UK) with a Magnesium Ka source (206 W). The sample size was 2 X 3 mm and the layer analysed was 50-100 Å. Elements were identified from the survey spectra. The high resolution spectrum of each peak was determined at a passage energy of 20 eV. The value of the C1s component was corrected by applying 285 eV.

Water contact angle measurements

Static contact angles were measured at room temperature using a goniometer (Ramé-Hart, Netcong, NJ, USA) equipped with a microliter syringe. A drop of liquid (2 μL of ultrapure water with an electrical resistance of 17.8 M Ωcm) was placed on the surfaces using the syringe. The water contact angles were estimated on the plain surface by optical image analysis on both sides of at least three droplets. This was done twice for each material.

3.4.4. Adsorption of serum proteins onto PCL films

SDS-PAGE electrophoresis

The PCL films were sterilized by flooding with ethanol 70 % (v/v) for 30 min and washed 3 times with 2 mL PBS. The films were then incubated for 1 h with 10 % (v/v) FBS in PBS (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) at 37 °C under a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The PCL films were then washed 3 times with PBS and the proteins

were desorbed using Laemmli buffer (NuPAGE[®] LDS Sample Buffer 4X, Invitrogen). The resulting samples (20 mL) were loaded onto 10 % or 7.5 % polyacrylamide gels. Proteins were revealed by silver nitrate staining according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Canada). The molecular weights of the major protein bands and their densitometric analyses were determined using FluorChem[™] 5500 with AlphaEaseFC[™] Software, version 4.0.1. (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA).

Western blot analysis

The desorbed proteins were separated by SDS-PAGE electrophoresis as described above and transferred to nitrocellulose membranes using the Transblot[®]Semi-Dry electrophoretic transfer cell (Bio-Rad Laboratories). The nitrocellulose membranes were stained with Ponceau red (Sigma) to confirm transfer efficiency and then incubated overnight in 3 % (w/v) bovine serum albumin (BSA, Sigma) in PBS plus 0.1 % (v/v) Tween 20. The membranes were washed twice with PBS/0.1 % (v/v) Tween 20 and incubated at room temperature for 75 min with rabbit primary antibodies directed against fibronectin (diluted 1/500, Sigma) or rabbit primary antibodies directed against vitronectin (diluted 1/100, Abcam, Cambridge, MA, USA). The membranes were again washed three times with PBS/0.1 % (v/v) Tween 20 and the bound antibodies were revealed by incubation with peroxidase conjugated anti-rabbit IgG secondary antibodies (diluted 1/40,000, Sigma). All antibodies were diluted in PBS containing 0.1 % (v/v) Tween 20 and 0.1 % (w/v) BSA. Immunoreactive bands were visualized by chemiluminescence (ECL + Plus[™], GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and exposure to X-ray film (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Densitometric analyses were determined using FluorChem[™] 5500 with AlphaEaseFC[™] Software, version 4.0.1.

3.4.5. Cell experiments

Cell culture

Murine calvarial preosteoblasts MC3T3-E1 subclone 14 (CRL-2594[™], ATCC[®], Manassas, VA, USA) were grown at 37 °C in Minimum Essential Medium (MEM) alpha medium (α -MEM, Gibco[®], Grand Island, NY, USA) without ascorbic acid, supplemented with 10 % heat-inactivated FBS, 100 U/mL penicillin (Invitrogen) and 100 mg/mL streptomycin (Invitrogen) under a humidified 5 % CO₂ atmosphere until they reached 70 % confluence. Then, the cells were deprived of FBS for 24 h and removed by trypsinization

(Invitrogen). The trypsin was neutralized with trypsin inhibitor (Gibco®). The cells were washed once with α -MEM, collected by centrifugation, and suspended in α -MEM with or without 10 % FBS. The cells were seeded (10,000 cells/cm²) on 9.62 cm² cell culture treated PS or ethanol-sterilized PCL films (19.62 cm²) and incubated for 1 h at 37 °C under a humidified 5 % CO₂ atmosphere to allow them to become attached. Cells were used for experiments between passages 2 and 13.

Focal adhesion and cytoskeleton organization evaluated by immunofluorescence

Attached cells were fixed with 3 % (w/v) paraformaldehyde in PBS for 15 min at room temperature and permeabilized for 5 min with 0.5 % (v/v) Triton X100 in PBS. Non-specific binding sites on the PCL films were blocked by incubation with 1 % (w/v) BSA in PBS for 30 min at 37 °C under a humidified 5 % CO₂ atmosphere. Cells were immunostained by incubating them with mouse monoclonal antivinculin antibodies (diluted 1/50, Sigma), or mouse primary antibodies against phosphorylated FAK on Y³⁹⁷ (diluted 1/25, Millipore, Temecula, CA, USA). Bound primary antibodies were visualized by incubation with FITC-conjugated antimouse immunoglobulin (diluted 1/150, Sigma). All antibodies were diluted in PBS containing 0.1 % (w/v) BSA and cells were incubated with antibodies for 30 min at 37 °C under a humidified 5 % CO₂ atmosphere. Filamentous actin (F-actin) was also stained using rhodamine-phalloidin diluted 1/200 with 0.1 % (w/v) BSA in PBS (Invitrogen). The PS or PCL films were then washed, mounted on glass microscope slides and examined with an Eclipse TE2000-S microscope equipped with a 60 objective and a Retiga 1300R camera (Nikon). The area of cell spreading was evaluated using SigmaScan Pro V5 (Systat Software, San Jose, CA, USA).

FAK and Smad phosphorylation evaluated by western blots

Cells were seeded (20,000 cells/cm²) on PCL films (19.6 cm²) in serum-free medium with or without rhBMP-2 (100 ng/mL) and allowed to attach for 1 h at 37 °C under a humidified 5 % CO₂ atmosphere. They were then washed three times in PBS containing 1 mM orthovanadate (Sigma) and lysed at 4 °C in 100 mL 50mM Tris-HCl, pH 7.4 containing 0.1 % (v/v) SDS, a complete mini-protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) and 1 mM orthovanadate. Equal amounts of cell lysate proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Protein bands were revealed with the primary rabbit antibodies against phosphorylated

FAK (diluted 1/1000, Sigma), phosphorylated Smad1 (Ser463/465)/Smad5 (Ser463/465)/Smad8 (Ser426/428) (diluted 1/1000, Cell Signalling Technology, Pickering, ON, Canada), or total Smad 1/5/8 (diluted 1/1000, Santa Cruz, CA, USA). They were then washed four times with PBS containing 0.1 % (v/v) Tween 20, and antigen-antibody complexes were viewed by incubating them with peroxidase conjugated anti-rabbit IgG secondary antibodies (Sigma) diluted 1/20,000. All antibodies were diluted in PBS containing 0.1 % (v/v) Tween 20 and 0.1 % (w/v) BSA. The membranes were reprobbed with murine anti- β -actin antibodies (diluted 1/1500 in PBS/0.5 % (v/v) Tween 20/1 % (w/v) BSA, Sigma) and antigen-antibody complexes were viewed by incubating them with peroxidase-conjugated anti-mouse IgG secondary antibodies (Sigma) diluted 1/10,000 in PBS/0.5 % (v/v) Tween 20/1 % (w/v) BSA. Immunoreactive bands were visualized as described above.

3.4.6. Statistical analysis

All statistical computations were performed with GraphPad Instat[®] 3.00 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The Tukey-Kramer multiple comparison test (ANOVA) was used. Values were considered significantly different if $p < 0.05$.

3.5. Results and discussion

3.5.1. Characterization of PCL surface modification

Surface topography of PCL films

We prepared PCL films with an average thickness of $41.9 \pm 4.8 \mu\text{m}$ ($n = 3$), as determined by SEM. We first determined the effect of incubation with NaOH on the surface of these PCL films. They were examined by SEM before and after hydrolysis of the ester groups as well as after the grafting of the pRGD and pRGE peptides. The scanning electron micrographs revealed that untreated PCL film had some spherulites (Fig. 3.1A). These structures were well-defined and there were some dents between them. Ng *et al.* have developed a 5 mm thick PCL film that also has spherulites on its surface (Ng *et al.*, 2001). The spherulites and dents were less visible on the surface of hydrolyzed PCL (Hydro PCL) produced by alkaline treatment, while the surfaces of both pRGD and pRGE were similar to that of untreated PCL (Fig. 3.1A). However, AFM analysis (Fig. 3.1B) showed no great difference between untreated and Hydro PCL. The average surface roughness (R_a) measurements (Table 3.1) confirmed that the R_a values for untreated PCL,

Hydro PCL, pRGD and pRGE films were all similar ($p > 0.05$). However, Vance *et al.* found that NaOH treatment (1 mol/L for 10 min) of bulk PCL produced a nano-structured PCL with roughness varying from 50 to 100 nm (Vance *et al.*, 2004). The discrepancy between our results and those of Vance *et al.* might be due to the structure of PCL since we used PCL films while they used bulk material (Vance *et al.*, 2004). In contrast, Rouxhet *et al.* also showed that alkaline hydrolysis of PCL (2.5 mol/L, 40 °C for 2 h) eliminated the typical PCL surface morphology but they also found no significant change in the roughness (Rouxhet *et al.*, 1998).

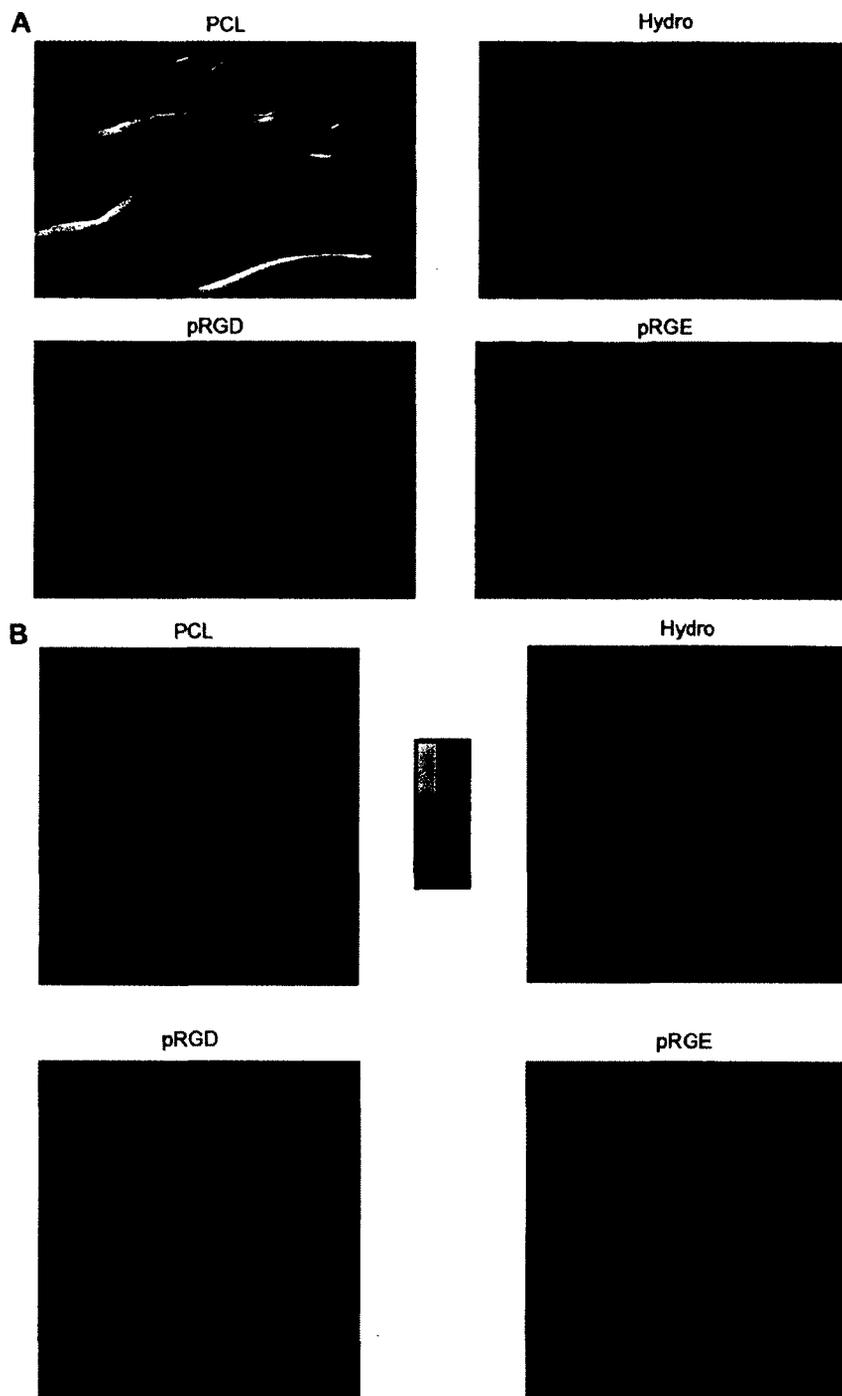


Fig. 3.1. (A) Scanning electron microscope images of PCL films, bar 50 μm . These observations are representative of two other independent experiments. (B) Atomic force microscope images of PCL films in air, scan size 5 μm x 5 μm data scale 0-0.1 V. Results are representative of three independent experiments.

Wettability of PCL films

We assessed the impact of alkaline treatment and PCL functionalization on surface wettability (Table 3.1). Measurements of water contact angles showed that untreated PCL films were moderately hydrophilic and that alkaline hydrolysis of the PCL ester groups significantly decreased these angles ($p < 0.001$). This increase in hydrophilicity was due to hydrolysis of the ester groups to hydroxyl and carboxyl groups, which were more hydrophilic than ester bonds (Sun and Öneby, 2006; Tan and Teoh, 2007). Khor *et al.* found that NaOH treatment (5 mol/L for 3 h) decreased the contact angle of PCL films from 68° to 45° (Khor *et al.*, 2003). But Vance *et al.* reported that alkaline treatment had no effect on wettability (Vance *et al.*, 2004). They measured similar hydrophobic water contact angles for untreated (90.1°) and NaOH (1 mol/L for 10 min) treated PCL (93.3°) (Vance *et al.*, 2004). Our measurements for PCL before and after alkaline hydrolysis therefore agree with those of Khor *et al.* and Sun and Öneby (Sun and Öneby, 2006; Khor *et al.*, 2003). Functionalizing the PCL film with pRGD and pRGE also significantly decreased the contact angle from that of untreated PCL ($p < 0.001$ and $p < 0.01$ respectively). Zhang and Hollister also found that the contact angle decreased by about 40 % from the untreated to the RGDC PCL films (Zhang and Hollister, 2009).

Table 3.1: Average surface roughness and static water contact angle measurements of PCL films.

Materials	PCL	Hydro	pRGD	pRGE
Ra (nm) ^a	20.31 ± 7.75	33.31 ± 2.39	20.78 ± 5.04	18.71 ± 6.24
Water contact angle (°) ^b	68.1 ± 1.0	52.3 ± 1.4	50.9 ± 0.9	55.3 ± 0.8

^a Values are the means ± SD of three independent measurements.

^b Values are the means ± SD of two independent experiments.

Surface composition

The active groups were immobilized on the surface by a method derived from that of Sun and Öneby (Sun and Öneby, 2006). The peptides pRGD and pRGE were linked to the surface through their cysteine residue at their N-terminal with PDEA. We verified this linkage using XPS and observed that there were both carbon/sulfur bonds and carbon/nitrogen bonds after grafting the PDEA onto the Hydro PCL films (Table 3.2). The

density of acid carboxylic groups was also increased by alkaline treatment, as measured by assaying thionine acetate (data not shown). There also seemed to be more carbon/nitrogen bonds on the PCL bearing pRGD or pRGE than on PCL bearing PDEA.

Table 3.2: XPS analysis of the PCL films

	Bond Energy (eV)	Identification	Membranes			
			Hydro	PDEA	pRGD	pRGE
C1s	285.4	C-S (at.%)		1.9	3.0	3.2
	285.9	C-N (at.%)		3.8	5.2	4.5
O1s	534.8	H2O (at.%)	6.2	6.1	4.6	5.7

Results are the means of two independent experiments

3.5.2. Non-specific adsorption of serum proteins onto PCL

SDS-PAGE electrophoresis

We developed PCL films functionalized with peptides to enhance their interaction with preosteoblasts. We therefore determined whether these materials non-specifically adsorbed proteins from FBS as this type of adsorption could interfere with surface functionalization. The SDS-PAGE profiles of desorbed proteins from the Hydro PCL, pRGD and pRGE films stained with silver nitrate (Fig. 3.2A) showed a major and intense band at 68 kDa and less intense bands at 52 kDa, 77 kDa and 250 kDa. The major 68 kDa band might be due to albumin, since this protein is adsorbed mainly onto hydrophilic surfaces because of its high concentration in serum (Collier *et al.*, 1997). Densitometric analysis of the 68 kDa band performed on four independent experiments revealed that a similar amount of proteins was adsorbed onto Hydro PCL, pRGD and pRGE films (Fig. 3.2B, $p > 0.05$). Rouxhet *et al.* used single radiolabelled protein solution to show that albumin was adsorbed onto Hydro PCL with a plateau at 1300 ng/cm² (Rouxhet *et al.*, 1998).

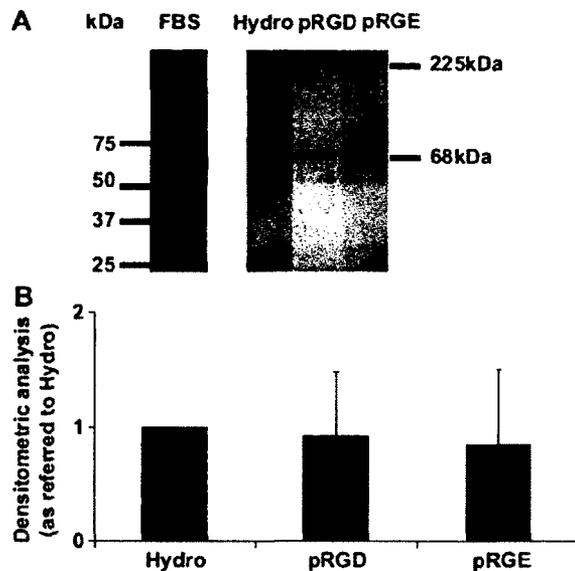


Fig. 3.2. (A) SDS-PAGE under reducing conditions of proteins desorbed from Hydro PCL, pRGD and pRGE that had been incubated with FBS for 1h as described in Materials and Methods. FBS is used as a control. This experiment is representative of four independent experiments. (B) The protein 68 kDa band separated by SDS-PAGE was quantified by densitometry for four independent experiments and quantified by densitometric analysis. The results are expressed relative to the protein eluted from Hydro PCL.

Fibronectin and vitronectin adsorption

We also determined the ability of the PCL films to adsorb the serum adhesive proteins, fibronectin and vitronectin after 10 % FBS incubation for 1 h. These proteins, which interact with cells *via* integrins, favour cell attachment and spreading (Schneider and Burridge, 1994). Immunoblotting was performed on desorbed proteins, and fibronectin was detected as a single band of about 250 kDa under all experimental conditions (Fig. 3.3A). This molecular weight was characteristic of the protein in reducing conditions, as demonstrated by a positive control using bovine fibronectin. The 250 kDa band was very faint and seemed to be similar for all the types of PCL film. This might be because serum contains less fibronectin than does plasma, since much of this protein is lost during fibrin clot formation (Hayman *et al.*, 1985). Rouxhet *et al.* have shown that PCL hydrolyzed with NaOH (2.5 mol/L 40 °C during 2 h) adsorbed fibronectin from a single protein solution with a plateau at 250 ng/cm² (Rouxhet *et al.*, 1998). The vitronectin blots revealed a single 72 kDa band that was more intense than the fibronectin band (Fig. 3.3B). The PCL films

with and without peptides seemed to adsorb similar amounts of vitronectin from FBS. Thus, PCL films adsorbed both fibronectin and vitronectin from serum after incubation for 1 h.

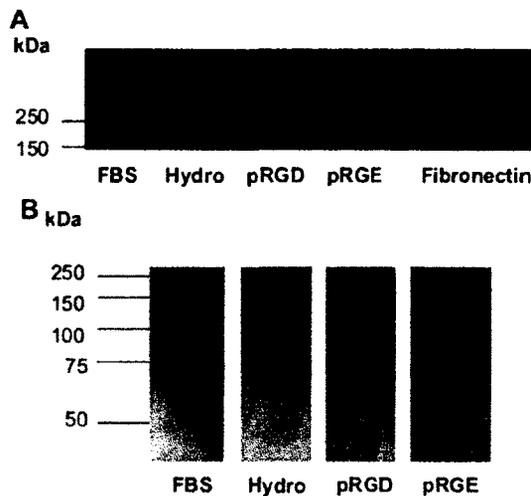


Fig. 3.3. Western blot analysis of (A) fibronectin and (B) vitronectin of desorbed proteins from Hydro PCL, pRGD and pRGE that had been incubated with FBS for 1h, as described in Materials and Methods. FBS and bovine fibronectin were used as a control. This experiment is representative of three independent experiments.

3.5.3. Cytoskeleton organization in 10 % FBS

Both fibronectin and vitronectin from serum play crucial roles in the attachment of cells onto substrata (Steele *et al.*, 1995). Schneider and Burridge demonstrated that most of the MC3T3-E1 preosteoblasts seeded onto glass coverslips or titanium disks coated with serum had adhered to vitronectin after incubation for 2 h (Schneider and Burridge, 1994). We therefore analysed the impact of non-specific adsorption of serum proteins on the morphology and cytoskeletal organization of MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL films that had been incubated for 1 h in medium containing 10 % FBS (Fig. 3.4). Cells attached to Hydro PCL films were used as controls (Fig. 3.4A). The cells on Hydro PCL remained rounded up and they neither organized the vinculin at their cell peripheries nor their actin cytoskeleton. These results were quite surprising since carboxylic groups increase the hydrophilicity of the surface and usually help cells to spread (Faucheux *et al.*, 2004). Also, although the MC3T3-E1 preosteoblasts attached to pRGE started to spread, their staining pattern of the vinculin was not characteristic of well organized focal adhesion points and they lacked actin stress fibres (Fig. 3.4A). Only a few of the spread cells on pRGD had organized cytoskeleton, while most of the cells attached to PS, used as a

positive control, had well organized focal adhesion points with actin stress fibres. Lastly, cells on pRGD spread over a greater area than did those on Hydro PCL ($p < 0.05$), but there was no significant difference between the spreading of cells on pRGD and pRGE after incubation for 1 h in the presence of 10 % FBS (Fig. 3.4B).

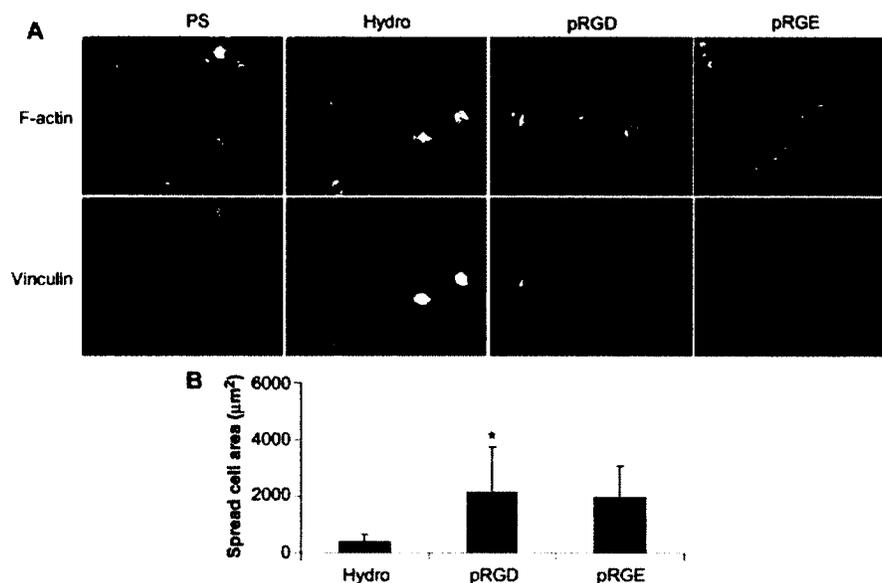


Fig. 3.4 (A) MC3T3-E1 cells were incubated with PCL films for 1 h in medium containing 10 % FBS. The attached cells were fixed, permeabilized and stained with monoclonal antibodies to vinculin and phalloidin-rhodamine to label filamentous actin (F-actin). The bound antibodies were detected with FITC-conjugated goat anti-mouse. Bar = 100 µm. (B) Areas of MC3T3-E1 spreading on PCL films after incubation for 1 h in medium containing 10 % FBS. 5 images of each independent experiment were captured with the fluorescent microscope (60x objective) and quantified. A total of three independent experiments were used. (* $p < 0.05$ versus Hydro).

Thus cells incubated in medium containing serum did not strongly interact with the Hydro PCL films. The adhesive proteins vitronectin and fibronectin adsorbed to Hydro PCL, as shown by western blots analysis, might be not recognized because there were not enough of them, and/or their conformation was altered. However, Zhang *et al.*, who used a short RGDC sequence immobilized onto a PCL scaffold by aminolysis, found that rat bone marrow stromal cells attached better to RGDC functionalized PCL than to control PCL after incubation for 4 h in medium containing 10 % serum (Zhang *et al.*, 2009a). We also found that most of the cells on pRGD and pRGE behaved similarly in the presence of

serum, which highlights the importance of using negative peptides as controls to clearly demonstrate the efficiency of the selected positive ones.

3.5.4. Cytoskeleton organization and FAK activation in serum-free medium

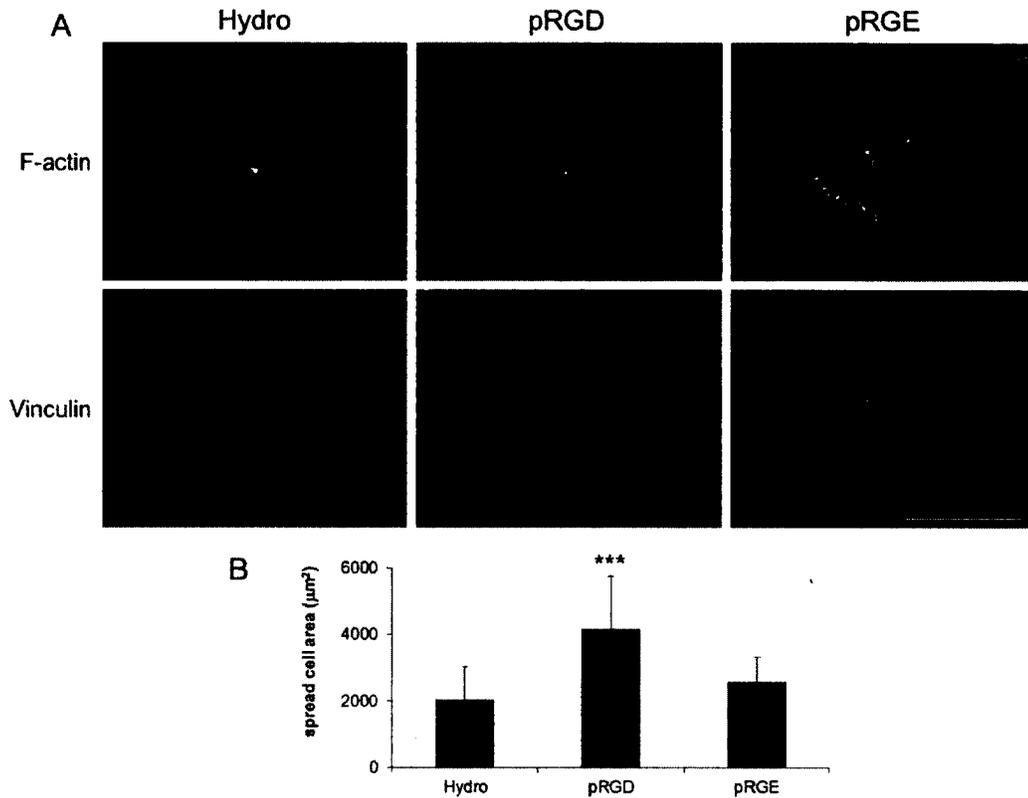


Fig 3.5. (A) MC3T3-E1 cells incubated with PCL films for 1 h in serum-free medium. The cells attached to Hydro PCL, pRGD and pRGE were fixed, permeabilized and stained with monoclonal antibodies to vinculin and phalloidin-rhodamine to label F-actin. The bound antibodies were detected with FITC-conjugated goat anti-mouse. Bar = 100 µm. (B) Areas of MC3T3-E1 spreading on PCL films after incubation for 1 h in serum-free medium. 5 images of each independent experiment were captured with the fluorescent microscope (60x objective) and quantified. A total of three independent experiments were used. (***) $p < 0.001$ versus Hydro and pRGE)

We checked the impact of adhesive peptides by analysing the cytoskeletal organization of cells on Hydro PCL, pRGD and pRGE in serum-free medium using vinculin and actin labelling (Fig. 3.5A). The cells attached to Hydro PCL were rounded up and had no organized cytoskeleton. There were also only a few cells on the surface. In contrast, the cells on pRGD started to spread, stained intensely for vinculin at their

peripheries, which is characteristic of focal adhesion points, and possessed actin stress fibres. Only some cells were attached to pRGE and a few of them were flattened with small focal adhesion complexes at their periphery as shown in Fig. 3.5A. Rezanian *et al.* also observed focal adhesion points in rat calvarial osteoblasts attached to a quartz surface grafted with pRGD that had been incubated for 2 h in medium containing 1 % (w/v) BSA, while cells seeded on pRGE had no organized cytoskeleton (Rezanian *et al.*, 1997). The cytoskeletal organization of cells in serum-free medium indicates, therefore, that they interact better with pRGD peptides than with Hydro PCL or pRGE. This result is confirmed by the larger spread area of the cells on pRGD than of cells on Hydro PCL and pRGE ($p < 0.001$) (Fig. 3.5B). Rapuano *et al.* first defined pRGD as the minimal sequence necessary to favour the attachment of MC3T3-E1 preosteoblasts after incubation for 2 h in serum-free medium (Rapuano *et al.*, 2004). Since only the preosteoblasts on pRGD had organized cytoskeleton in serum-free medium, we examined the influence of pRGD on FAK phosphorylation on Y³⁹⁷ by immunostaining (Fig. 3.6A) and western blotting (Fig. 4.6B). FAK is involved in the integrity of the cytoskeleton, and is activated via autophosphorylation at Y³⁹⁷ that is initiated by the binding of integrin to its ligand (Wozniak *et al.*, 2004; Schaller *et al.*, 1994). Only cells attached to pRGD were strongly labelled for phosphorylated FAK at their peripheries in structures characteristic of focal adhesion points after incubation in serum-free medium for 1 h (Fig. 3.6A). There was no specific staining at the peripheries of cells on Hydro PCL or pRGE. This was confirmed by western blotting for phosphorylated FAK on Y³⁹⁷ in the lysates of MC3T3-E1 preosteoblasts attached to Hydro PCL, pRGD or pRGE and incubated for 1 h in serum-free medium (Fig. 3.6B). The phosphorylated FAK on Y³⁹⁷ band at 125 kDa was more intense in lysates of cells on pRGD than in lysates of cells on Hydro PCL or pRGE. Immunoblots for β -actin to verify protein loading revealed a single 42 kDa band in all experimental conditions, all of which had similar intensities. Zhang *et al.* have obtained similar results using rat bone marrow stromal cells (Zhang and Hollister, 2009). They observed higher amount of phosphorylated FAK on Y³⁹⁷ with the short RGDC peptides compared to the control PCL film after 4 h in serum-free medium. Indeed, the autophosphorylation of FAK on Y³⁹⁷ is crucial for the subsequent activation of this kinase and its role in regulating cell behaviour such as cell survival (Frisch *et al.*, 1996).

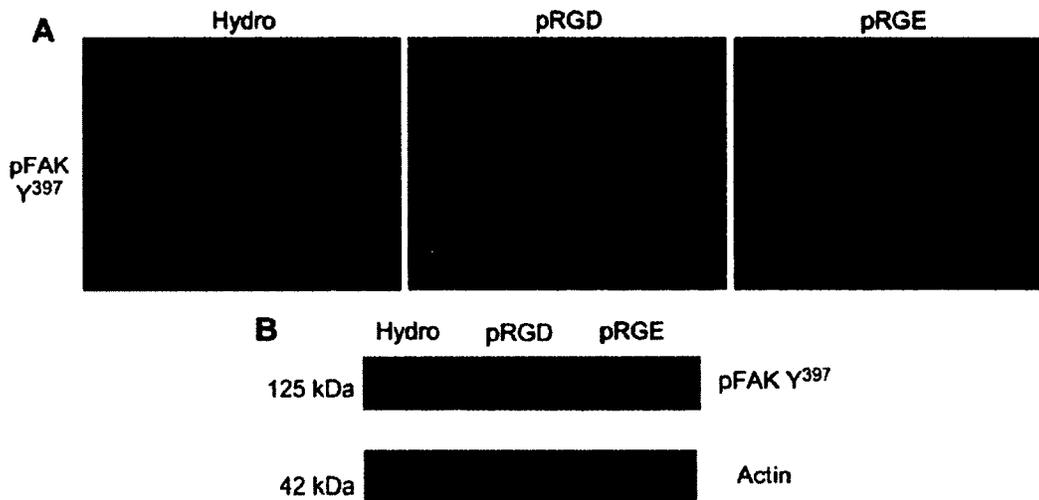


Fig. 3.6. (A) Fluorescent microscopy images showing immunolabelling for phosphorylated FAK (pFAK) on Y³⁹⁷ in lysates of MC3T3-E1 cells attached to Hydro PCL, pRGD and pRGE films by incubation for 1 h in serum-free medium. Bar = 100 μ m. (B) Western blot of pFAK on Y³⁹⁷ in lysates of MC3T3-E1 cells attached to Hydro PCL, pRGD and pRGE films by incubation for 1 h in serum-free medium as described in Materials and Methods. This experiments is representative of three independents experiments.

3.5.5. Smad pathway activation induced by rhBMP-2 in serum-free medium

Since FAK is involved in modulating the effects of BMPs on osteoblastic cells, we examined the responses of MC3T3-E1 preosteoblasts on pRGD and pRGE to rhBMP-2 in serum-free medium (Tamura *et al.*, 2001). BMPs act on cells by activating the Smad pathway. BMPs bound to type I and type II receptors induce the phosphorylation of type I receptors by type II, which in turn promote the phosphorylation of Smad (R-Smad) made up of Smad 1/5/8 (Miyazono, 1999). Then two R-Smads form a complex with Smad 4 that translocates into the nucleus and activates osteoblast-specific genes (Miyazono, 1999). We used western blotting to examine the phosphorylation state of Smad 1/5/8 in cells on pRGD and pRGE with or without rhBMP-2 (100 ng/mL) (Fig. 3.7). Phosphorylated Smad 1/5/8 and total Smad 1/5/8 produced a band at about 60 kDa in all experimental conditions. Immunoblots reprobred with anti- β -actin antibodies revealed a single band at 42 kDa. Incubation with rhBMP-2 increased the intensity of the phosphorylated Smad 1/5/8 band in MC3T3-E1 preosteoblasts attached to pRGD to about 160 % of that in untreated cells, as revealed by densitometric analysis of the phosphorylated Smad 1/5/8 band referred to that

of actin (Fig. 3.7). In contrast, rhBMP-2 had no effect in cells attached to pRGE after incubation for 1 h in serum-free medium. Only cells on pRGD that had phosphorylated FAK at their focal adhesion points responded to rhBMP-2. Indeed, inhibition of FAK using an overexpression of antisense FAK messenger RNA can prevent ALP activity in MC3T3-E1 preosteoblasts induced by rhBMP-2 (100 ng/mL) (Tamura *et al.*, 2001). Several studies have demonstrated that growth factors and integrins cooperate to regulate osteoblast behaviour. For example, the $\alpha_v\beta$ integrins are important for BMP-2 function in human osteoblasts (Lai and Cheng, 2005). Lai and Chen observed that the $\alpha_v\beta$ integrins and the BMP-2 receptors were co-localized (Lai and Cheng, 2005). Moreover, inhibiting $\alpha_v\beta$ integrins function by α_v integrin antibodies L230 prevents the Smad signalling induced by BMP-2. We have previously shown that MC3T3-E1 preosteoblasts incubated for 1 h in serum-free medium are attached to pRGD coated PS through their $\alpha_v\beta$ integrin subunits (Marquis *et al.*, 2008). We now find that MC3T3-E1 preosteoblasts on pRGD-functionalised PCL respond to rhBMP-2 through activation of their canonical Smad pathway. Further experiments are required to demonstrate the combined effects of the pRGD PCL films and rhBMP-2 on the longer term behaviour of MC3T3-E1 preosteoblasts.

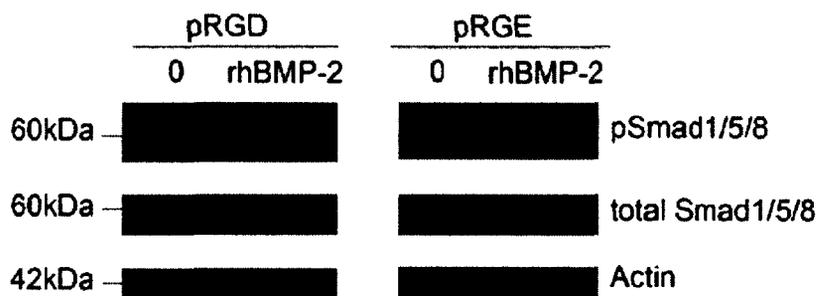


Fig. 3.7. Western blot analysis of phosphorylated Smad 1/5/8, total Smad 1/5/8 in lysates of MC3T3-E1 cells attached to pRGD and pRGE PCL films by incubation for 1 h in serum-free medium with or without rhBMP-2 (100 ng/mL). This experiment is representative of three independent experiments.

3.6. Conclusion

We have prepared and characterized PCL films functionalized with positive (pRGD) and negative (pRGE) adhesion peptides. These PCL films adsorb both fibronectin and vitronectin but do not strongly promote actin cytoskeletal organization or cell spreading in murine preosteoblasts incubated with medium containing 10 % FBS for 1 h. In contrast, only preosteoblasts on pRGD PCL films organized their cytoskeleton and activated

intracellular FAK signaling when incubated in serum-free medium. These cells also responded to rhBMP-2 by activating the Smad pathways. Thus, PCL functionalized with pRGD may be used in tissue engineering applications in well-defined serum-free medium supplemented with rhBMP-2.

Acknowledgments

We thank Dr Owen Parkes for editing the English text, and Jennifer Roy and Marie-Claude Boivin for technical assistance. This work was supported by the Collaborative Health Research Projects of the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and Canada Institute of Health Research (CIHR). Eric Bergeron was supported by a Fonds de la recherche en santé du Québec fellowship. N. Fauchoux has held a Canada Research Chair in Cell-Biomaterial Biohybrid Systems.

Appendix

Figures with essential color discrimination. Fig. 1 in this article has parts that are difficult to interpret in black and white. The full color images can be found in the online version at [doi:10.1016/j.biomaterials.2010.05.010](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.05.010).

4. CHAPITRE 4

EFFET DE LA BMP-2 ET/OU DE LA BMP-9 SUR DES PRÉOSTÉOBLASTES ATTACHÉS À DU POLYCAPROLACTONE FONCTIONNALISÉ PAR UN PEPTIDE D'ADHÉSION EXTRAIT DE LA SIALOPROTÉINE OSSEUSE

Titre original : Effect of BMP-2 and/or BMP-9 on préostéoblastes attached to polycaprolactone functionalized by adhesive peptides derived from bone sialoprotein

Auteurs et affiliations:

O Drevelle, M.Sc., Etudiant au doctorat, Cell-Biomaterials Biohybrid Systems, Université de Sherbrooke, Department of Chemical Engineering and Biotechnological Engineering.

A Daviau, M.Sc., Assistant de recherche, Cell-Biomaterials Biohybrid Systems, Université de Sherbrooke, Department of Chemical Engineering and Biotechnological Engineering.

MA Lauzon Bc, Etudiant à la maîtrise, Cell-Biomaterials Biohybrid Systems, Université de Sherbrooke, Department of Chemical Engineering and Biotechnological Engineering.

N Fauchoux, PhD, Professeur, Cell-Biomaterials Biohybrid Systems, Université de Sherbrooke, Department of Chemical Engineering and Biotechnological Engineering

Date d'acceptation : Octobre 2012

Etat de l'acceptation : Publié

Revue : Biomaterials

Contribution au document:

Cet article contribue au document en présentant :

- L'adhésion et la survie cellulaire au contact du PCL-pRGD et/ou PCL-pRGE
- L'identification de la concentration optimale de la BMP-2 et de la BMP-9 à utiliser

- La cinétique de signalisation des Smads, β -caténine, p38, ERK1/2 et JNK et la translocation des Smads en présence de la BMP-2 et/ou de la BMP-9 dans les préostéoblastes murins adhérant au PCL-pRGD
- La différenciation des préostéoblastes murins adhérents par l'expression de l'ARNm codant pour Dlx5, Ostérix et l'OC en réponse aux BMPs
- La mesure de l'activité de l'ALP après trois jours chez les préostéoblastes murins adhérents en réponse aux BMPs

4.1. Résumé français

Les biomatériaux fonctionnalisés par des peptides d'adhésion favorisent les interactions entre les cellules et le substrat. Cependant leur influence sur la réponse cellulaire aux facteurs de croissance est encore peu comprise. Nous avons déjà montré que la BMP-2 n'active la voie des Smads que dans les préostéoblastes murins MC3T3-E1 adhérents à un film de polycaprolactone (PCL) fonctionnalisé par des peptides RGD dérivés de la sialoprotéine osseuse (pRGD). Nous avons maintenant analysé comment les protéines humaines recombinantes BMP-2 et/ou BMP-9 (0,38 nM) pouvaient influencer la transduction du signal et la différenciation des préostéoblastes MC3T3-E1 attachés au PCL-pRGD. Tandis que les cinétiques d'activation des MAPKs étaient similaires dans les cellules traitées par la BMP-2 et la BMP-9, il a été possible d'observer des cinétiques d'activation de la voie des Smads et de stabilisation de la β -caténine différentes. Ainsi, la BMP-2 a induit la phosphorylation des Smad1/5/8 dès 0,5 h contre 4h pour la BMP-9, tandis que seules les cellules traitées par la BMP-9 présentaient une diminution de la β -caténine dès 2h. Cependant, les deux BMPs ont été capables d'induire la translocation des Smad1/5/8 phosphorylées dans le noyau à 4 h et d'augmenter non seulement le niveau des transcrits Dlx5, ostérix et ostéocalcine mais également l'activité de l'ALP à 72 h. Une combinaison BMP-2/BMP-9 qui permettait un maintien des niveaux de la β -caténine et une légère diminution de la phosphorylation des Smads à 4h a induit des résultats similaires à ceux obtenus avec la BMP-2 seule. Ainsi il est important de déterminer comment les matériaux biomimétiques influencent la réponse des cellules aux BMPs.

4.2. Abstract

Biomaterials functionalized by adhesive peptides improve the cell-substratum interaction. However, their influence on the response of cells to growth factors is still poorly understood. We have shown that bone morphogenetic protein (BMP) 2 activates the Smad pathway only in murine MC3T3-E1 preosteoblasts attached to polycaprolactone (PCL) film functionalized by RGD peptides derived from bone sialoprotein (pRGD). We have now analysed the way recombinant human BMP-2 and/or BMP-9 (0.38 nM) influence the signal transduction and differentiation of MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD. While kinetics of MAPK activation were similar in cells treated by BMP-2 and BMP-9, different kinetics of Smad activation and β -catenin stabilization were observed. BMP-2 induced Smad1/5/8 phosphorylation within 0.5 and BMP-9 within 4 h, while the β -catenin was lower at 2 h only in cells treated with BMP-9. However, both BMPs induced the translocation of phosphorylated Smad1/5/8 to the nucleus at 4 h and increased Dlx5, osterix and osteocalcin transcripts as well as alkaline phosphatase activity at 72 h. A BMP-2/BMP-9 combination that maintained the β -catenin amount constant but reduced that of phosphorylated Smad within 4 h had quite similar effect than BMP-2 alone. It is therefore important to determine how biomimetic materials influence the response of cells to BMPs.

4.3. Introduction

Bone healing involves several types of cells, including osteoblasts, osteoclasts and various growth factors (Al-Aql *et al.*, 2008). In 1965, Urist found that molecules extracted from demineralized bone induced new bone formation when implanted in the rectus abdominus muscles of rabbits (Urist, 1965). These molecules were later identified as bone morphogenetic proteins (BMPs) (Urist and Strates, 1971). The 20 BMPs that have been identified to date belong to the transforming growth factor- β family. BMP-2, BMP-4, BMP-5, and BMP-6 are critical for several steps in fracture healing, like cartilage formation and resorption, primary bone formation and secondary bone formation and remodelling (Al-Aql *et al.*, 2008; Cho *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2010). The USA Food and Drug Administration has already approved the use of recombinant human BMP-2 loaded in a collagen sponge, known as Infuse Bone Graft® from Medtronic, to repair tibial bone fractures and for spinal fusion (Burkus *et al.*, 2004). BMP-9 has been shown recently to be more osteogenic than BMP-2 (Kang *et al.*, 2004). Several research groups have therefore studied the effect on osteoblast differentiation of BMP-9 alone, or combined with

compounds like retinoic acids, dexamethasone, or Wnt (Zhang *et al.*, 2010; Mikami *et al.*, 2010; Luther *et al.*, 2011). While the role of BMP-9 in bone healing remains unclear, several studies have shown that this protein, produced by liver cells, is also present in platelets and circulates in the blood plasma (2-12 ng/mL) (Celeste *et al.*, 1994; Osada *et al.*, 2012; Bidart *et al.*, 2012). BMP-9 transcripts have also been detected in both human endochondral and intramembranous bones (Suttapreyasri *et al.*, 2006). Thus, it may be of interest to combine BMP-2 and BMP-9 to get a better bone forming cell functions.

The BMPs act on cells by binding to serine/threonine kinase type I and type II receptors. BMP-2, a member of the BMP-2/BMP-4 subfamily, mainly interacts with ALK3/6 type I receptors, while BMP-9, a member of the BMP-9/-10 subfamily, binds to ALK1/2 type I receptors (David *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2010). By their binding to two type I and two type II receptors, BMPs induce the activation of the canonical Smad pathway through phosphorylation of Smad1, Smad5 and Smad8. The phosphorylated Smads form complexes with Smad4 and are translocated to the nucleus where they activate the transcription of target genes like Runx2 and Osterix (Osx) (Miyazono, 1999; Matsubara *et al.*, 2008). However, BMPs can also trigger the activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway (Jun *et al.*, 2010). The MAPK pathways are composed of three components: p38, ERK1/2 and JNK MAPK. The differentiation of MC3T3-E1 preosteoblasts by BMP-2 requires the activation of p38 (Guicheux *et al.*, 2003). The Wnt canonical pathway is also an important regulator of the way BMPs trigger osteogenic differentiation (Tang *et al.*, 2009). The activation of the canonical Wnt pathway via the binding of Wnt molecules to their Frizzled and LRP5/6 receptors inhibits GS3K- β , which becomes unable to address β -catenin to the proteasome for degradation. The stabilized β -catenin can then be translocated to the nucleus, where it interacts with Lef1/Tcf to activate genes such as cJun (for review see van Amerongen and Nusse, 2009; Mann *et al.*, 1999; Gong *et al.*, 2001; Boyden *et al.*, 2002).

Third generation biomaterials presently used to fill bone defects mimick bone physiology to favour healing (Wojtowicz *et al.*, 2010). They interact better with cells than earlier biomaterials because their surface can be functionalized with several adhesive proteins or peptides containing the arginine-glycine-aspartic acid (RGD) cell-binding motif that is present in several adhesive proteins like fibronectin and vitronectin (Wojtowicz *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2009a; Drevelle *et al.*, 2010). The pRGD peptide AcCGNGEPRGDTYRAYNH₂ is derived from bone sialoprotein (BSP) and is recognized

by the α_v integrin subunits (Marquis *et al.*, 2008). This peptide, covalently bound to or adsorbed onto materials such as polycaprolactone (PCL) can enhance the interaction of cells with the biomaterials (Rezania and Healy, 1999a; Marquis *et al.*, 2008; Drevelle *et al.*, 2010). But little is known of the way adhesive peptides interacting with specific integrins influence the cell response to BMPs. Lai and Cheng (2005) have shown that BMPR-I and BMPR-II receptors are colocalized with α_v integrin subunits at focal adhesion points. The α_v integrin subunits are also required to enable human osteoblasts isolated from trabecular bone to respond to BMP-2 (100 ng/mL) (Lai and Cheng, 2005). BMP-2 can also increase the level of $\alpha_v\beta$ integrins on the surface of cells, showing that BMP signalling influences integrins (Lai and Cheng, 2005). We have also shown that the Smad pathway is activated only in murine MC3T3-E1 preosteoblasts seeded on a PCL film functionalized by pRGD (PCL-pRGD) in the presence of BMP-2 (50 ng/mL) while it is not in cells seeded on film bearing pRGE negative peptides (PCL-pRGE) (Drevelle *et al.*, 2010).

We have therefore analysed the cell signalling and differentiation of MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD in the presence of BMP-2, BMP-9, or a combination of the two molecules in serum-free medium. We first examined the attachment and/or survival of MC3T3-E1 preosteoblasts incubated for 24 and 72 h on PCL-pRGD or PCL-pRGE. We then used qPCR to determine the optimal concentrations of BMPs for use in the combined BMP-2/BMP-9 experiments. The phosphorylation state of Smad1/5/8 and MAPK proteins and the amount of β -catenin in MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD in the presence of BMP-2 and/or BMP-9 (0.38 nM) were then determined by western blotting. We also used immunolabelling to determine whether phosphorylated Smad was translocated to the nuclei of MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD with or without BMP-2 and/or BMP-9. Last, we determined the expression of genes encoding osteoblastic markers and the activity of alkaline phosphatase (ALP) to verify the differentiation of preosteoblasts.

4.4. Materials and methods

4.4.1. Materials

The peptide pRGD (Ac-CGGNGEPRGDTYRAY-NH₂) derived from BSP and the peptide pRGE (Ac-CGGNGEPRGETYRAY-NH₂) were synthesized by Celtek Peptides (Nashville, TN, USA) with a final purity of 98 %. Recombinant carrier-free human BMP-2 and BMP-9, synthesized in Chinese Hamster Ovary cells, were purchased from R&D

Systems (Minneapolis, MN, USA). 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) were purchased from Fluka (St. Louis, MO, USA). 2-(2-pyridinyldithio) ethaneamine hydrochloride (PDEA) was purchased from GE Healthcare (GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Sweden). Primary rabbit antibodies against phosphorylated Smad1 (Ser^{463/465})/Smad5 (Ser^{463/465})/Smad8 (Ser^{426/428}), phosphorylated Smad2 (Ser^{465/467}), total Smad1/5/8, phosphorylated p38, or total p38 and murine antibodies against phosphorylated ERK1/2, total ERK1/2 and total Smad2 were purchased from Cell Signalling Technology (Pickering, ON, Canada). Primary murine antibodies against β -catenin were purchased from BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA). Primary murine antibodies against phosphorylated JNK were purchased from Santa Cruz, CA, USA. Peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG secondary antibodies were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

4.4.2. Methods

Preparation of PCL films

PCL films were prepared as previously described (Drevelle *et al.*, 2010). Briefly, PCL in 1,4-dioxane (5 % w/v) were placed in glass Petri dishes and the solvent was evaporated by heating at 80 °C overnight. The films were then hydrolysed by incubation with 0.5 mol/L NaOH for 2 h under gentle agitation at room temperature. The dishes were then washed and filled with 0.01 mol/L HCl for 30 min at room temperature. The films were functionalized with EDC (0.904 mg/mL)/NHS (0.143 mg/mL) for 20 min at room temperature. The films were then covered with PDEA (0.15 mg/mL) for 1 h at room temperature, followed by pRGD solution (0.33 mg/mL) for 15 min at room temperature.

Cell experiments

Cell culture. Murine calvarial MC3T3-E1 preosteoblasts (subclone 14; CRL-2594, ATCC, Manassas, VA, USA) were grown at 37 °C in Minimum Essential Medium (MEM) alpha medium (α -MEM, Gibco®, Grand Island, NY, USA) without ascorbic acid, supplemented with 10 % heat-inactivated foetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin (Invitrogen) and 100 mg/mL streptomycin (Invitrogen) under a humidified 5 % CO₂ atmosphere until they reached 70 % confluence. The cells were then deprived of FBS for 24 h and removed by incubation with trypsin for 5 min at 37 °C. The trypsin was neutralized with trypsin inhibitor (Gibco). The detached cells were washed once with α -

MEM, centrifuged and suspended in α -MEM and seeded onto sterile PCL-pRGD and/or PCL-pRGE films.

Labelling of actin stress fibres and DNA. Cells were seeded (30 000 cells/cm²) onto sterile PCL films (19.62 cm²) and incubated at 37 °C for 24 and 72 h. They were fixed by incubation with 3 % paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) (w/v) for 15 min at room temperature and permeabilized by incubation for 5 min in Triton X100 in PBS (0.5 % v/v). Cells were incubated 30 min at 37 °C with 1 % bovine serum albumin (BSA) (w/v) in PBS to block non-specific binding sites. They were immunostained by incubation in rhodamine-phalloidin (Invitrogen) diluted 1/200 in PBS containing 0.1 % BSA (w/v) or stained with 4-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) (1 μ g/mL) in PBS. The surfaces were washed and mounted on glass microscope slides. They were examined using an Eclipse TE2000-S microscope, 20X objective, and a Retiga 1300R camera (Nikon).

TUNEL assays. TUNEL assays were performed using Click-iT® TUNEL Alexa Fluor® Imaging Assay (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the cells were seeded (30 000 cells/cm²) on sterile PCL-pRGD films (19.62 cm²) and incubated at 37 °C for 4 h and 72 h. They were fixed with 3 % paraformaldehyde in PBS (w/v) for 15 min at room temperature, washed and permeabilized for 20 min using Triton X100 in PBS (0.25 % v/v). A positive control using cells attached to PCL-pRGD for 4 h was performed by adding DNase to the cells for 30 min. The attached cells were then incubated with TdT reaction buffer for 10 min, with a cocktail of TdT for 1 h at 37 °C and finally with Click-iT® solution for 30 min at room temperature. DNA was stained with DAPI (1 μ g/mL) in PBS and the PCL films and cells were washed and mounted on glass microscope slides. They were examined with an Eclipse TE2000-S microscope equipped with a 40X objective and a Retiga 1300R camera.

Cell signalling evaluated by western blot analysis. Cells were seeded as described above and stimulated with or without equimolar concentrations (0.38 nM) of BMP-2, BMP-9 or BMP-2/BMP-9 for 0, 0.5, 1, 2 or 4 h and 6 h for β -catenin. The cells were then washed three times with 1 mM orthovanadate (Sigma) in PBS and lysed at 4 °C in 150 mL 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 containing 0.1 % (v/v) SDS, a complete mini-protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) and 1mM orthovanadate. Equal amounts of cell lysate proteins were separated by SDS-PAGE. The separated proteins were transferred to nitrocellulose membranes using the Transblot® Semi-Dry electrophoretic

transfer cell (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Canada). These membranes were stained with Ponceau red (Sigma) to confirm transfer efficiency. They were washed three times with 0.1 % (v/v) Tween 20 in PBS and protein bands were revealed by incubation with primary rabbit antibodies raised against phosphorylated Smad1 (Ser^{463/465})/Smad5 (Ser^{463/465})/Smad8 (Ser^{426/428}) (diluted 1/1000), total Smad1/5/8 (diluted 1/1000), phosphorylated Smad2 (Ser^{465/467}) (diluted 1/1000), phosphorylated p38 (diluted 1/1000), or total p38 (diluted 1/1000). Primary mouse antibodies against β -catenin (diluted 1/1000), total Smad2 (diluted 1/1000), phosphorylated ERK1/2 (diluted 1/1000), total ERK1/2 (diluted 1/2000), or phosphorylated JNK (diluted 1/1000) were also used. The membranes were then washed three times with Tween 20 (0.1 % v/v) in PBS and antigen-antibody complexes were detected by incubating them with peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG secondary antibodies diluted 1/20000. All antibodies were diluted in PBS containing 0.1 % (v/v) Tween 20 and 5 % (w/v) skimmed milk. The membranes were re-probed with murine anti- β -actin antibodies (diluted 1/5000 in PBS/Tween 20 0.5 % (v/v)/skimmed milk 5 % (w/v), Sigma) and antigen-antibody complexes were viewed by incubating them with peroxidase-conjugated anti-mouse IgG secondary antibodies diluted 1/10000 in PBS/Tween 20 0.5 % (v/v)/skimmed milk 5 % (w/v). Immunoreactive bands were visualized by chemiluminescence (ECL PlusTM, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and exposure to X-ray film (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Densitometric analyses were performed using FluorChemTM 5500 with AlphaEaseFCTM Software, version 4.0.1.

Immunolabelling of phosphorylated Smad1/5/8. Cells were seeded as described above and incubated with or without 0.38 nM BMP-2, BMP-9, or BMP-2/ BMP-9 for 1 h or 4 h, fixed, permeabilized and incubated for 30 min at 37 °C with 1 % BSA (w/v) in PBS to block non-specific binding sites. The cells were then immunostained by incubation with primary rabbit antibodies against phosphorylated Smad1 (Ser^{463/465})/Smad5 (Ser^{463/465})/Smad8 (Ser^{426/428}) (diluted 1/50). Bound primary antibodies were visualized by incubation with FITC-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibodies (diluted 1/150, Sigma). DNA was stained with DAPI (1 μ g/mL) in PBS. The cells on PCL-pRGD were then washed, mounted on glass microscope slides and examined with an Eclipse TE2000-S microscope, under a 60X objective, and a Retiga 1300R camera.

mRNA extraction and qPCR. Cells were seeded (30 000 cells/cm²) onto sterile PCL films functionalized by pRGD, allowed to become attached by incubation at 37 °C for 1 h,

and then stimulated with or without 0.38 nM BMP-2, BMP-9 or a combination of BMP-2/BMP-9 for 4, 24 or 72 h. Total RNA was then extracted using RNeasy Mini Kits according to manufacturer's instruction (Qiagen), dissolved in water and quantified using a GeneQuant pro spectrophotometer. An aliquot of RNA (1 µg) was treated with DNase and first-strand cDNA was synthesized using oligo(dT) primers and Superscript II reverse transcriptase. This cDNA was subjected to quantitative PCR on an iQ5™ Real-Time PCR detection system in a 25 µL volume using iQ™ SYBR™ Green SuperMix (Bio-Rad Laboratories). The primers for murine GAPDH (Mm_GAPDH_3_SG), Dlx5 (Mm_DLX5_1_SG), Runx2 (Mm_RUNX2_1_SG), Osx (Mm_SP7_1_SG), osteocalcin (Mm_bglap_1_SG) and ALP (Mm_ALPL_2_SG) were purchased from Qiagen. Assays were normalized to GAPDH and analysed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ model. The quality of the PCR products was determined by electrophoresis on 4 % agarose gels (w/v) containing ethidium bromide. The AmpliSize™ Molecular Ruler 50-2000 bp Ladder (Bio-Rad Laboratories) was run as a control on each gel, all primers gave a single band.

Determination of EC₅₀ using Osx transcripts. Cells seeded (30 000 cells/cm²) onto sterile PCL films functionalized by pRGD were incubated at 37 °C for 1 h to allow them to adhere, and then with or without BMP-2 or BMP-9 (0.19-3.8 nM) for 24 h. Osx transcripts were quantified by qPCR as described above. The results were reprocessed using MatLab software and the EC₅₀ was determined with a Michaelis-Menten model.

ALP activity measurement. Cells (30 000 cells/cm²) on sterile PCL-pRGD were first incubated at 37 °C under a humidified 5 % CO₂ for 1 h. They were then stimulated with or without an equimolar concentrations of 0.38 nM BMP-2, or BMP-9, or a combination of BMP-2/BMP-9 for 72 h. The ALP activity was measured with the SensoLyte® pNPP alkaline phosphatase assay kit (Anaspec, Fremont, CA, USA) according to the manufacturer's instruction. Briefly, cells were washed twice with assay buffer, lysed with 200 µL of lysis buffer (0.2 % Triton X100 in assay buffer (v/v)) and the lysates were centrifuged at 2500 g. The resulting supernatants were collected and ALP activity was measured by incubation with the pNPP alkaline phosphatase substrate for 1 h. Optical density was measured at 405 nm using a UV/Vis spectrophotometer (Synergy HT Bio Tek instrument, VT, USA). The ALP activity was determined with reference to the ALP activity of a standard curve and then to the total protein amount.

Statistical analysis

All statistical computations were performed with GraphPad InStat® 3.00 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The Tukey-Kramer multiple comparison test (ANOVA) was used. Values were considered significantly different if $p < 0.05$.

4.5. Results

4.5.1. Cell survival on functionalized PCL films

We have previously shown that MC3T3-E1 preosteoblasts attached and developed organized actin cytoskeleton at 1 h in serum-free medium only on PCL-pRGD (Drevelle *et al.*, 2010). We first investigated the ability of MC3T3-E1 preosteoblasts to remain attached to PCL films functionalized with pRGD or pRGE for 24 and 72 h in serum free medium (Fig. 4.1A). MC3T3-E1 preosteoblasts were stained with rhodamine-phalloidin to visualize the actin cytoskeleton and DAPI for labelling the DNA. The MC3T3-E1 preosteoblasts remained attached to PCL-pRGD for 72 h, but only a few cells remained attached to PCL-pRGE at 72 h and none remained attached at 6 days (data not shown). Since most of the MC3T3-E1 preosteoblasts seeded onto pRGE detached within 72 h, this condition could not be used as a control for cell differentiation assays. TUNEL assays were also done to determine whether any MC3T3-E1 preosteoblasts on PCL-pRGD underwent apoptosis (Fig. 4.1B). A positive control using DNase treatment on preosteoblasts attached to PCL-pRGD for 4 h revealed that all preosteoblasts had fragmented DNA. Their nuclei were strongly labelled by the TUNEL assay. In contrast, only few cells on PCL-pRGD were stained by the TUNEL assay at 4 h. Most of the MC3T3-E1 preosteoblasts on PCL-pRGD for 72 h showed little DNA damage when stained with the TUNEL assay and their nuclei were well defined. The percentage of apoptotic cells was evaluated by counting the TUNEL-positive cells in a total of 500-800 cells for each condition (Table 4.1). Fewer than 15 % of MC3T3-E1 preosteoblasts attached to the PCL-pRGD became apoptotic within 72 h.

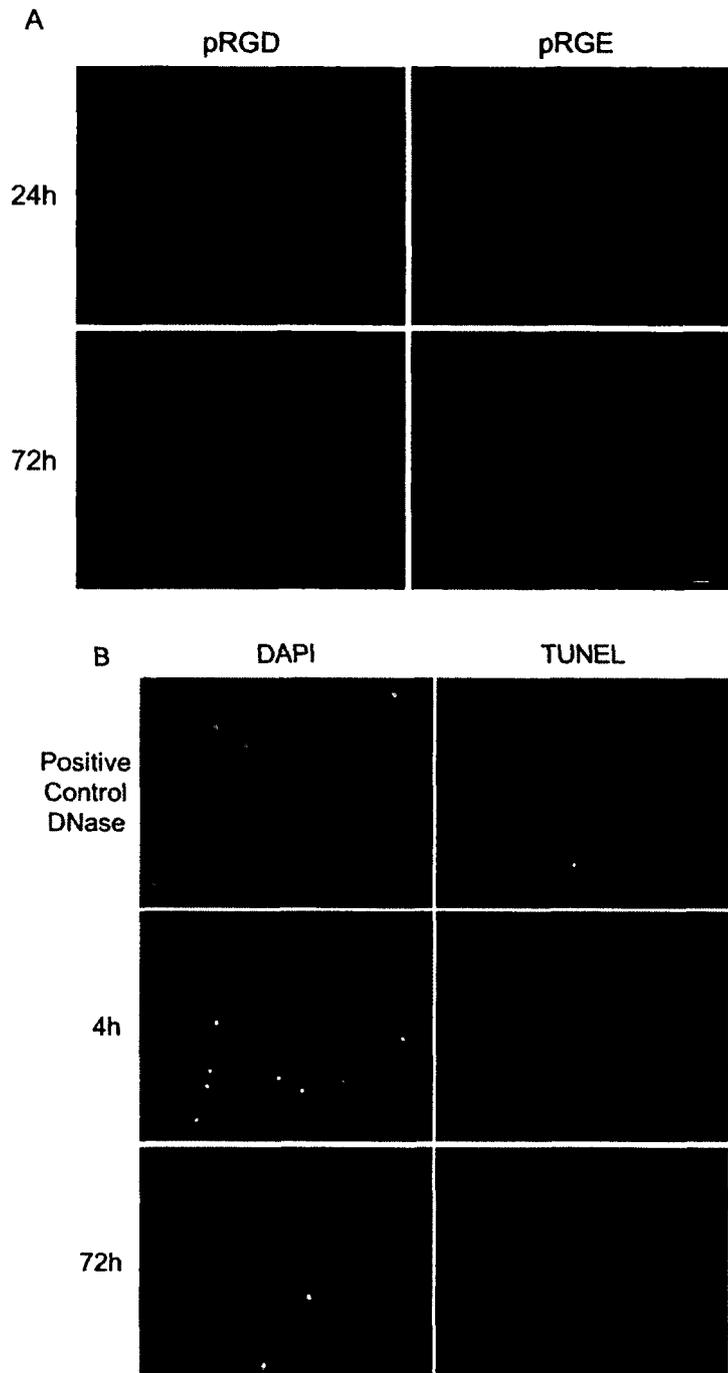


Fig. 4.1 (A) MC3T3-E1 preosteoblasts were seeded onto PCL-pRGD or PCL-pRGE films and incubated for 4 h or 72 h in FBS-free medium. The attached cells were fixed, permeabilized and stained with rhodamine-phalloidin to label filamentous actin and with DAPI to stain DNA. Bar = 100 μ m (B) MC3T3-E1 preosteoblasts seeded onto PCL-pRGD films and incubated for 4 to 72 h without serum. The attached cells were fixed, permeabilized and stained with TUNEL assay to label damaged DNA and with DAPI to label DNA. Bar = 50 μ m. This experiment is representative of three independent experiments.

Table 4.1: Positive cell counting from TUNEL assay.

t (h)	4	72
% positive TUNEL cells	6 ± 4	12 ± 5
Number of total counted cells	800	564

Results are the mean ± SD of three independent experiments.

4.5.2. Dose response effect of BMP-2 and BMP-9 on Osx transcripts

Since BMP-2 and BMP-9 were to be used together, we determined the concentration of each BMP that can be used without reaching a plateau in gene activation. We measured the effects of incubation for 24 h with concentrations of BMP-2 and BMP-9 from 0.19 to 3.8 nM on the levels of Osx mRNA in MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD (Fig. 4.2). The mRNA amounts were normalized to that of the untreated cells (CTL). BMP-2 increased the level of Osx transcripts in a dose dependant manner (for example, significant difference between 0.192 and 0.38 nM ($p < 0.05$)). The level of Osx transcripts reached a plateau when the cells were incubated with 1.92 nM BMP-2 (Fig. 4.2A). BMP-9 increased the levels of Osx mRNA in MC3T3-E1 preosteoblasts even at 3.8 nM (Fig. 4.2B). We determined the EC_{50} value for each BMP using the Michaelis-Menten model applied to the Osx mRNA level. The EC_{50} for BMP-2 was 0.81 nM and that for BMP-9 was 1.18 nM. We therefore used a concentration of 0.38 nM in subsequent experiments.

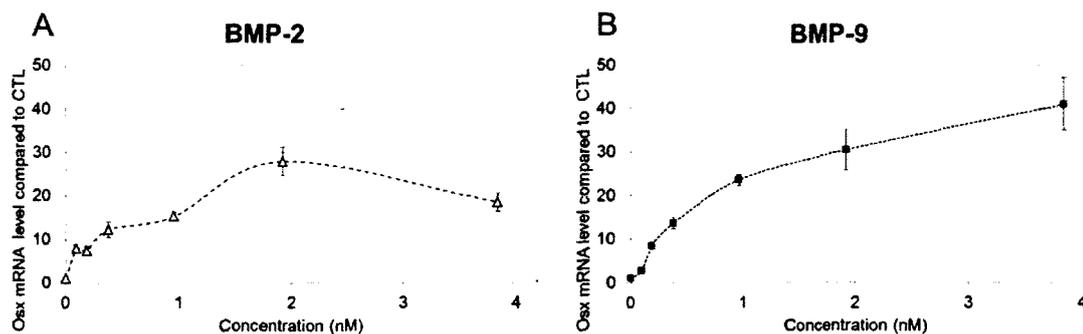


Fig. 4.2. Effect of incubation for 24 h with concentrations from 0.19 to 3.8 nM of (A) BMP-2 and (B) BMP-9 on MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD. mRNA encoding Osx quantified by qPCR was normalized to mRNA in untreated cells (CTL). The results are the mean ± SD of two independent experiments performed in triplicate.

4.5.3. Kinetics of the BMP signaling pathway activation in MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD by BMP-2 and/or BMP-9

Smad pathway

Incubation with BMP-2 (3.8 nM) for 1 h induced the phosphorylation of Smad1/5/8 in MC3T3-E1 preosteoblasts on PCL-pRGD (Drevelle *et al.*, 2010). We therefore determined the rate of Smad1/5/8 and Smad2 activation induced by equimolar concentrations (0.38 nM) of BMP-2 and/or BMP-9 (Fig. 4.3). MC3T3-E1 preosteoblasts were allowed to attach to PCL-pRGD for 1 h and then incubated with or without BMP-2 and/or BMP-9 for 0, 0.5, 1, 2 and 4 h. Equal amounts of cell lysate proteins were then analysed by western blotting for phosphorylated Smad1/5/8 (Fig. 4.3A). Total Smad1/5/8 was also used as control. The intensities of the bands corresponding to total Smad1/5/8 were quite similar in all experimental conditions and gave a single band of about 60 kDa. MC3T3-E1 preosteoblasts stimulated by incubation with BMP-2 or BMP-2/BMP-9 for 0.5 h to 4 h all contained phosphorylated Smad1/5/8. However, the phosphorylated Smad1/5/8 band was seen only in MC3T3-E1 preosteoblasts that had been treated with BMP-9 for 4 h. Densitometric analyses of the phosphorylated Smad1/5/8 band referred to that of the total protein showed that the relative amount of phosphorylated Smad1/5/8 induced by BMP-2 was higher after 0.5 h. They also confirmed that the Smad pathway was activated only after incubation with BMP-9 for 4 h (Fig. 4.3B). Incubation with BMP-2/BMP-9 caused a slight decrease in phosphorylated Smad1/5/8 at 4 h. Lastly, we detected no phosphorylation of Smad2 in MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD after incubation with BMP-2 and/or BMP-9 for 1 to 4 h (Fig. 4.3C). However a positive control using MC3T3-E1 preosteoblasts on polystyrene revealed that they responded to TGF- β (10 ng/mL) by increasing Smad2 phosphorylation.

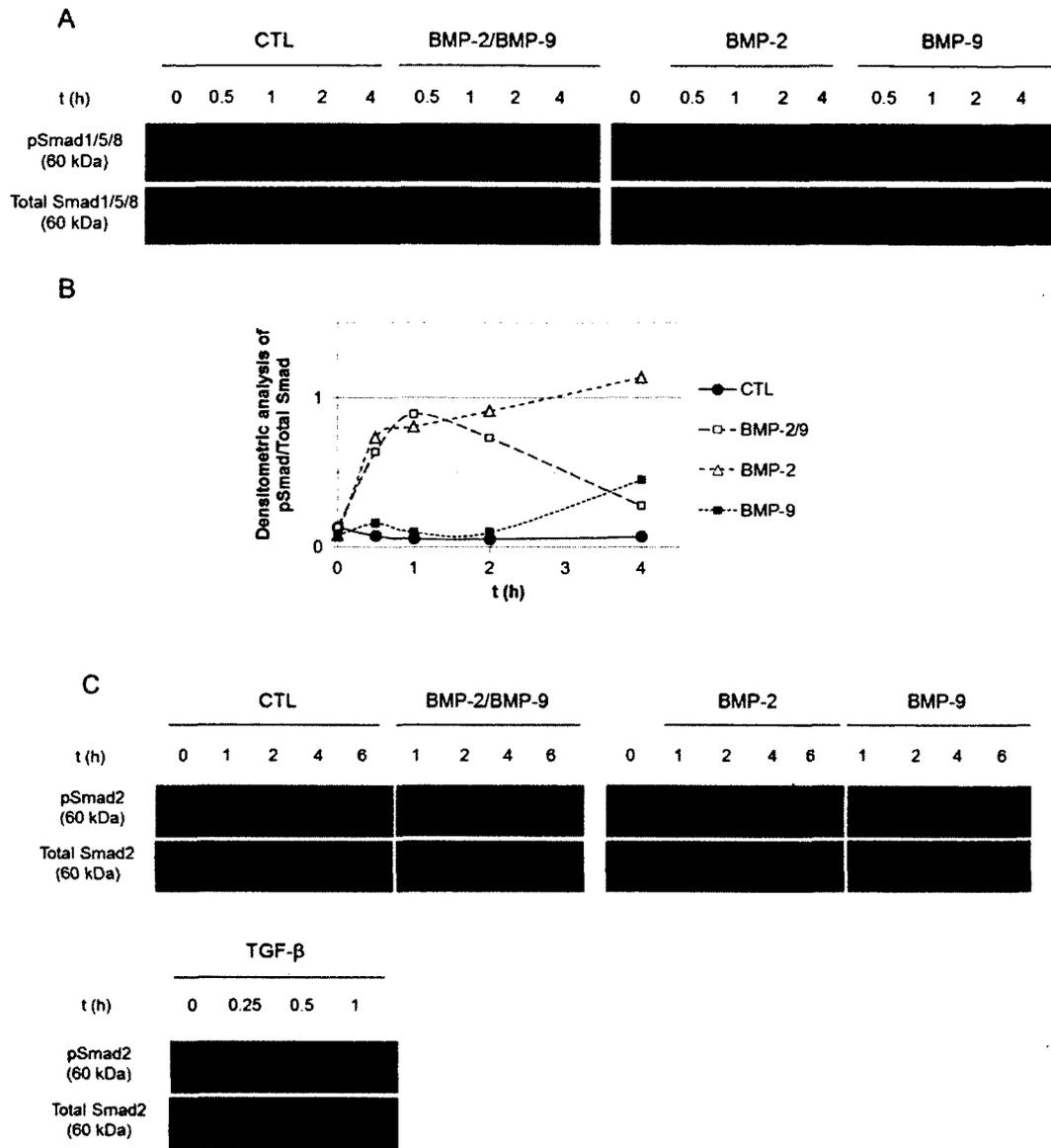


Fig 4.3. (A) Western blot analysis and (B) densitometric analysis of the kinetics of Smad1/5/8 phosphorylation and total Smad1/5/8 in lysates of MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD for 1 h and then stimulated with 0.38 nM BMP-2 and/or BMP-9 for 0, 0.5, 1, 2 and 4 h. (C) Western blot analysis of the phosphorylated Smad2 and total Smad2 in lysates extracted from MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD for 1 h and then stimulated with 0.38 nM BMP-2 and/or BMP-9 for 0, 1, 2, 4 and 6 h. The positive control was the effect of TGF- β (10 ng/mL) on cells attached to polystyrene after 1 h incubation.

The translocation of phosphorylated Smad1/5/8 to the nucleus is an important step in the transduction of the BMP signal leading to specific gene transcription (for review see Massagué *et al.*, 2005; Heining *et al.*, 2011). We therefore used immunofluorescent labelling of phosphorylated Smad1/5/8 to monitor their translocation to the nuclei of MC3T3-E1 preosteoblasts treated with BMP-2 and/or BMP-9 for 4 h (Fig. 4.3D). DNA labelling by DAPI staining confirmed the nuclear localisation of phosphorylated Smad1/5/8. There was very little immunostaining of phosphorylated Smad1/5/8 in the CTL (untreated) cells. By contrast, MC3T3-E1 preosteoblasts treated with BMP-2 and/or BMP-9 were clearly stained for phosphorylated Smad1/5/8, which was mainly in their nuclei. Stimulation with BMP-2/BMP-9 seemed to induce less intense staining for phosphorylated Smad1/5/8 than did incubation with BMP-2 or BMP-9 alone.

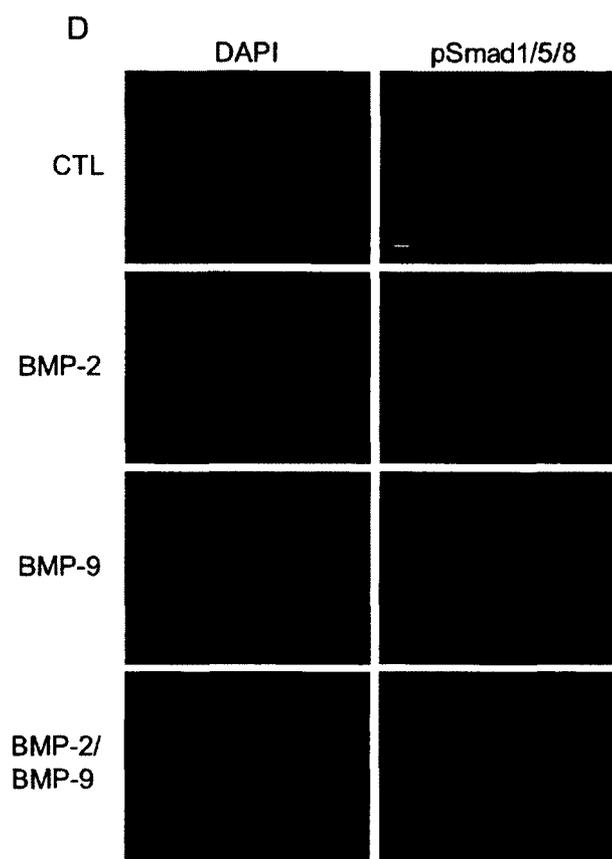


Fig. 4.3. (D) MC3T3-E1 preosteoblasts seeded onto PCL-pRGD films were incubated for 4 h without serum. The attached cells were fixed, permeabilized and incubated with rabbit antibodies against pSmad1/5/8 and with DAPI to label DNA. The bound antibodies were detected with FITC-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibodies. Bar = 20 μ m. This experiment is representative of four independent experiments.

MAPK pathway

Both BMP-2 and BMP-9 activate the canonical Smad pathway; they can also stimulate the MAPK pathway (Guicheux *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2012b). We therefore measured the rates at which equimolar concentrations (0.38 nM) of BMP-2 and/or BMP-9 activated the MAPK pathway after 0, 0.5, 1, 2 and 4 h (Fig. 4.4). Equal amount of proteins from cell lysates were analysed by western blotting for phosphorylated JNK, p38 and ERK1/2 (Fig. 4.4A). Total p38, ERK1/2 and β -actin were used as controls. The intensity of the bands corresponding to total p38, ERK1/2 proteins and β -actin (42 kDa) were similar in all experimental conditions. The intensity of the protein band corresponding to the phosphorylated JNK (50 kDa) was decreased at 4 h in all experimental conditions. Phosphorylated p38 appeared as a single band at 43 kDa. The rate of p38 phosphorylation was similar in all experimental conditions. The phosphorylated p38 profile showed a maximum phosphorylation at 0.5 h followed by a rapid decrease. No phosphorylated p38 was detected after incubation for 2 h in all experimental conditions. The rates of ERK1/2 (42-44 kDa) phosphorylation were similar in all experimental conditions. Densitometric analyses of the phosphorylated p38 and ERK1/2 bands referred to that of their respective total protein bands confirmed the above observations (Fig. 4.4B).

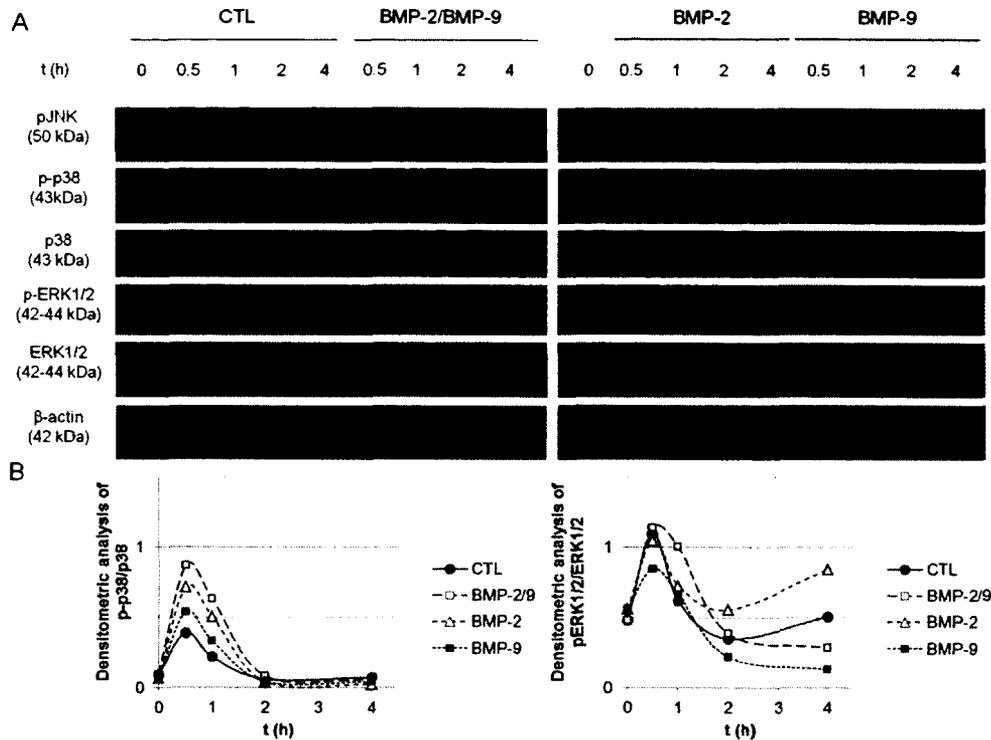


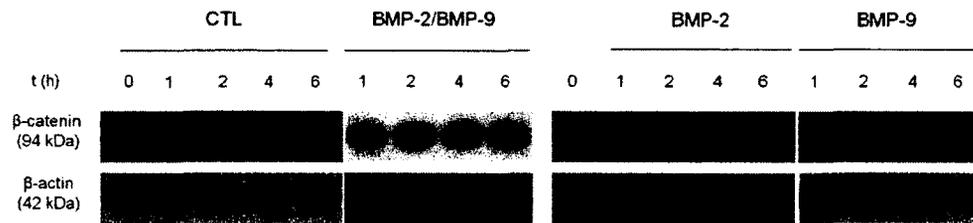
Fig. 4.4 (A) Western blot analysis and (B) densitometric analysis of phosphorylated JNK, p38, ERK1/2 and total p38, ERK1/2 and β -actin in lysates of MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD for 1h and then stimulated with BMP-2 and/or BMP-9 (0.38nM) for 0, 0.5, 1, 2 and 4 h. This experiment is representative of four independent experiments.

4.5.4. Beta-catenin in MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD and treated by BMP-2 and/or BMP-9

We measured the level of β -catenin because the differentiation of murine C3H10T1/2 stem cells into mature osteoblasts by adenovirus expressing BMP-9 (AdBMP-9) requires a functional canonical Wnt pathway by stabilizing the β -catenin (Tang *et al.*, 2009). We incubated MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD for 1 h with or without BMP-2 and/or BMP-9 for up to 6 h and measured the β -catenin cell lysate proteins by western blotting (Fig. 4.5). β -catenin appeared as a single 94 kDa band in all experimental conditions (Fig. 4.5A). The amount of the control β -actin band remained constant. The β -catenin level seemed to decrease only in cells treated with BMP-9. The densitometric analysis of the intensity of the β -catenin band referred to that of β -actin revealed that the level of β -catenin amount increased between 2 and 6 h in cells treated

with BMP-2, but remained unchanged for 4 h with or without BMP-2/BMP-9 (Fig. 4.5B). The level of β -catenin in MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD and incubated with BMP-9 alone decreased dramatically between 1 h and 6 h. The intensity of the β -catenin band at 4 h was about 40 % of the initial β -catenin level and no β -catenin band was detected at 6 h.

A



B

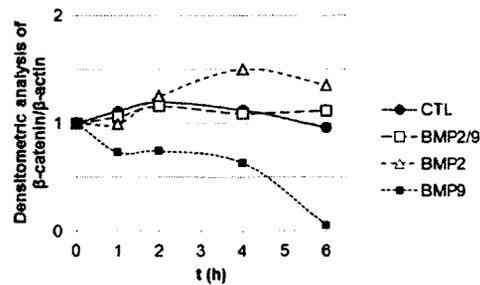


Fig. 4.5. (A) Western blot analysis and (B) densitometric analysis of the β -catenin and β -actin in lysates of MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD for 1 h and stimulated with BMP-2 and/or BMP-9 (0.38nM) for 0, 1, 2, 4 and 6 h. This experiment is representative of two independent experiments.

4.5.5. Differentiation of MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD in the presence of BMP-2 and/or BMP-9

Expression of early (Dlx5, Osx) and late (osteocalcin) marker genes

Since the rates of Smad activation and the β -catenin levels were different in cells treated with BMP-2 and BMP-9, we determined the influence of BMP-2 and/or BMP-9 on the activity of genes encoding early (Dlx5 and Osx) and late (osteocalcin) osteogenic marker (Fig. 4.6). The amount of Dlx5 (Fig. 4.6A) and Osx (Fig. 4.6B) mRNAs at 4 and 24 h respectively were higher than CTL in cells incubated with 0.38 nM BMP-2 ($p < 0.001$),

BMP-9 ($p < 0.001$) and BMP-2/BMP-9 ($p < 0.01$). Furthermore, the levels of *Dlx5* transcripts in cells treated with BMP-2, BMP-9 and BMP-2/BMP-9 for 4 h were all similar ($p > 0.05$). In contrast, the levels of *Osx* transcripts differed, a significant difference was observed in cells treated by BMP-2 in comparison to BMP-9 ($p < 0.05$). The *Osx* transcript levels were similar in cells treated by BMP-2 and BMP-2/BMP-9 ($p > 0.05$). The gene encoding osteocalcin was more active in MC3T3-E1 preosteoblasts incubated with BMP-2 for 72 h than in cells incubated for the same time with BMP-9 ($p < 0.05$). However, BMP-2/BMP-9 had no significant effect on the levels of osteocalcin transcripts in comparison to BMP-2 ($p > 0.05$) (Fig. 4.6C). ALP mRNA was not detected in the CTL ($Ct > 31$) but the ALP gene was slightly activated after incubation with BMP-2 ($Ct = 27.23$), BMP-9 ($Ct = 29.36$) and BMP-2/BMP-9 ($Ct = 26.34$) (data not shown).

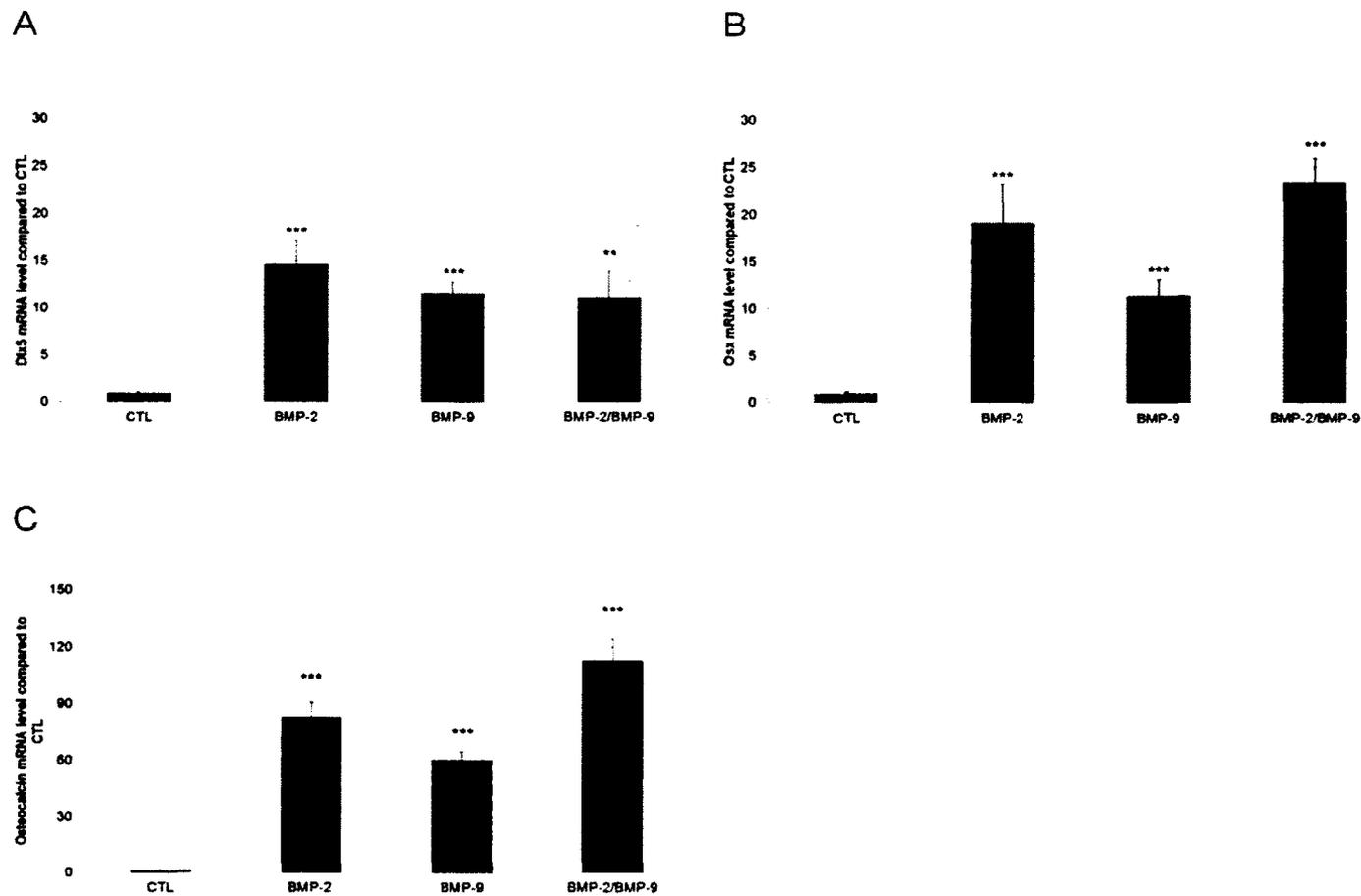


Fig. 4.6. Differentiation of MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD for 1 h without serum and then stimulated with BMP-2 and/or BMP-9 (0.38 nM). The mRNAs encoding (A) Dlx5 (4 h), (B) Osx (24 h) and (C) osteocalcin (72 h) were quantified by qPCR and normalized to the mRNAs in untreated cells (CTL). The results are the mean \pm SD of two independent experiments performed in triplicate. Statistically different from the CTL *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$.

ALP activity

We measured ALP activity to further verify the differentiation of MC3T3-E1 preosteoblasts (Fig. 4.7). Unstimulated, control MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD had no ALP activity, even after incubation for 72 h. By contrast, ALP activity was detected in cells treated with 0.38 nM BMP-2, BMP-9 or BMP-2/BMP-9. Incubation with BMP-2/BMP-9 resulted in 2.3 times higher ALP activity in comparison to BMP-9 ($p < 0.05$), but they give similar results than BMP-2 alone ($p > 0.05$).

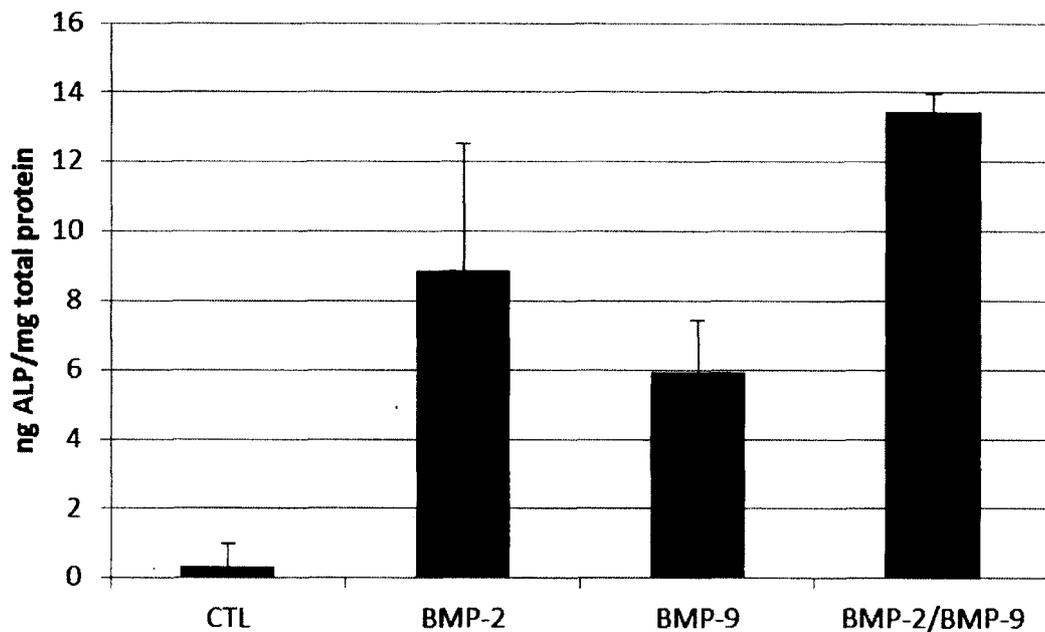


Fig. 4.7. Differentiation of MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD for 1 h without serum and then stimulated with BMP-2 and/or BMP-9 (0.38 nM) for 72 h. ALP activity was referred to the total protein concentration. The results are the means \pm SD of two independent experiments performed in duplicate.

4.6. Discussion

We have previously shown that murine MC3T3-E1 preosteoblasts in serum-free medium became attached to PCL-pRGD films and developed an organized actin cytoskeleton at 1 h, while similar cells placed on pRGE were less spread out and did not form focal adhesions (Drevelle *et al.*, 2010). In addition, only preosteoblasts attached to PCL-pRGD responded to

BMP-2 through activation of the Smad pathway. We have now focused on the responses of MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD to BMP-2 and/or BMP-9 in terms of signal transduction and subsequent differentiation. MC3T3-E1 preosteoblasts became detached from PCL-pRGE films after incubation for 72 h, while most of those on PCL-pRGD films remained spread and viable. We therefore carried out no further studies on cells on pRGE.

We have determined that MC3T3-E1 preosteoblasts can be incubated with a combination of 0.38 nM BMP-2 and 0.38 nM BMP-9 because the EC_{50} for *Osx* gene expression was about 0.81 after incubation with BMP-2 and 1.18 nM after incubation with BMP-9. This EC_{50} value for BMP-2 was 86 times smaller than that obtained by Ruppert *et al.* (1996), who measured ALP activity in murine C3H10T1/2 stem cells. Furthermore, David *et al.* (2007) measured the activity of luciferase reporter gene as an indicator of BMP element promoter in response to BMP-9 in human dermal microvascular endothelial cells and obtained an EC_{50} of 45 $\mu\text{g/mL}$ (2.04 μM). This value is much (578 times) lower than that obtained in the present study (David *et al.*, 2007). However, since our culture system was completely different from those used by Ruppert *et al.* (1996) and David *et al.* (2007) (cell type, medium, cells cultured on polystyrene vs functionalized PCL) such differences were not surprising. Furthermore, the concentration of BMP-9 used in the present study (8.5 ng/mL) is in the same range as that found in blood plasma (2-12 ng/mL) (Celeste *et al.*, 1994).

We therefore determined the effect of BMP-2 and/or BMP-9 (0.38 nM) on signal transduction in MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD. Surprisingly, we found that the rate of Smad1/5/8 activation with BMP-2 differed from that produced by BMP-9. While BMP-2 triggered the activation of the Smad pathway within 0.5 h, this stimulation required incubation with BMP-9 for 4 h. BMP-9 (1 ng/mL) is known to cause phosphorylation of Smad2 in human pulmonary artery endothelial cells, but we observed no Smad2 phosphorylation in our experimental condition (Park *et al.*, 2012b). These results suggest that the Smad2 signal did not replace Smad1/5/8 cell signalling in our experimental model. Furthermore, MC3T3-E1 preosteoblasts can produce BMP-2 and BMP-4 when they start to differentiate, but we detected no gene expression of BMP-2 or BMP-4 compared to CTL in cells treated with BMP-2 and/or BMP-9 (data not shown) (Xiao *et al.*, 2002). This suggests that the activation of Smad1/5/8 in cells treated by BMP-9 does not depend on the synthesis of

BMP-2 or BMP-4. In addition, our finding that 0.38 nM BMP-2 activates the Smad pathway in preosteoblasts attached to PCL-pRGD agrees well with the results obtained by Guicheux *et al.* (2003). They found that incubating MC3T3-E1 preosteoblasts attached to Petri dishes with BMP-2 (100 ng/mL) in culture medium containing foetal calf serum for 15 min to 6 h resulted in the phosphorylation of Smad1/5/8.

The difference in the time at which BMP-2 and BMP-9 activated Smad in our experimental conditions might be also partly explained by the fact that they are members of different BMP subfamilies and therefore act via different type I receptors (David *et al.*, 2007). Furthermore, the effect of BMP-9 on MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD differed from its effect on cells attached to polystyrene, unlike BMP-2. Indeed, we have previously found that incubation for 1 h with BMP-9 or BMP-2 (1.92 nM) in serum free medium caused Smad phosphorylation in MC3T3-E1 preosteoblasts attached to polystyrene (Bergeron *et al.*, 2009). We confirmed that incubation for 1 h with both 0.38 nM BMP-9 and 0.38 nM BMP-2 induced the phosphorylation of Smad1/5/8 in cells attached to polystyrene (data not shown). The main difference between these studies and our present model is that pRGD peptides target the $\alpha_v\beta_3$ integrins, while several integrins can be used by cells that have first adhered to treated polystyrene in the presence of FBS (Rezania and Healy, 1999b). Lai and Cheng (2005) have also shown that the $\alpha_v\beta_3$ integrins and the receptors of type I and II of BMP-2 (BMPRI and BMPRII) are located together. They found that the $\alpha_v\beta$ integrins were necessary for Smad phosphorylation induced by BMP-2 (Lai and Cheng, 2005). However, nothing is known about crosstalk between BMP-9 and $\alpha_v\beta_3$ integrin signalling.

We also find that both BMP-2 and BMP-9 activated the MAPK pathway at quite similar rates. It is known that p38 must be activated for recombinant human BMP-2 and AdBMP-9 to induce the differentiation of MC3T3-E1 preosteoblasts or murine C3H10T1/2 in culture medium containing serum (Guicheux *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2012). Guicheux *et al.* (2003) have observed that 100 ng/mL BMP-2 rapidly activated p38 in MC3T3-E1 preosteoblasts in serum-containing medium for 2 to 4 h, and obtained similar results for JNK MAPK.

We also measured the level of β -catenin to investigate further the difference in the effects of BMP-2 and BMP-9 on cell signalling. There is crosstalk between the Wnt and BMP pathways (Nakashima *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2012). For example, activation of the Wnt

pathway in MC3T3-E1 preosteoblasts triggers the activation of an autocrine BMP-2 loop (Cho *et al.*, 2012). Furthermore, deletion of the gene encoding β -catenin impairs the differentiation of primary murine osteoblasts in response to BMP-2. This demonstrates that β -catenin is a key factor in BMP-2 signalling (Zhang *et al.*, 2009b). We find that BMP-2 and BMP-9 have different effects on β -catenin stabilization. BMP-9 causes the phosphorylation of Smad1/5/8 and a decrease in β -catenin level in MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD. In contrast, BMP-2 activates Smad1/5/8 with a stabilization of the β -catenin level. The β -catenin level even increased slightly in cells incubated with BMP-2 for 2 to 6 h, but no β -catenin was detected in cells incubated with BMP-9 for 6 h. Zhang *et al.* (2009b) showed that the level of β -catenin in MC3T3-E1 preosteoblasts incubated with higher concentrations of BMP-2 (50 and 100 ng/mL) for 24 h was higher than in controls. BMP signalling can also modulate activation of the Wnt pathway by stimulating the synthesis of Wnt receptors (LRP5) and inhibiting the E3 ligase involved in the degradation of the β -catenin (Zhang *et al.*, 2009b). The decrease in the β -catenin level in MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD triggered by BMP-9 is quite interesting. Indeed, Tang *et al.* (2009) studied murine C3H10T1/2 stem cells transfected with AdBMP-9 and showed that incubation for 7 days resulted in activation of the canonical Wnt signalling pathway and increased ALP activity.

While there are clearly major differences in their signal transduction, both BMP-2 and BMP-9 induced the translocation of Smad1/5/8 to the nuclei of MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD films after incubation for 4 h and activated the genes encoding early and late osteogenic markers after incubation for 72 h. However, the *Osx* and osteocalcin transcripts were significantly lower in cells treated by BMP-9 in comparison to BMP-2 which is confirmed by the measurement of the ALP activity after 72 h. Nevertheless, the effect of incubation with a mixture of BMP-2 and BMP-9 was quite similar to that of incubation with BMP-2 alone. The BMP-2/BMP-9 combination had similar effects on cell signalling as BMP-2 alone in terms of β -catenin stabilization and Smad activation. The level of phosphorylated Smad1/5/8 in cells incubated with BMP-2/BMP-9 for 4 h was only slightly lower than in cells incubated with BMP-2 alone. The similar effect of BMP-2/BMP-9 combination on the expression of osteogenic genes and ALP activity in comparison to BMP-2 alone may be due to the signal transduction induced by BMP-2 blocking the cell's response to BMP-9. Further

experiments on signalling are therefore required to verify this hypothesis. Perhaps the sequential use of BMP-2 and BMP-9 may overcome this problem.

4.7. Conclusion

BMP-2 and BMP-9 activate Smad and stabilize β -catenin in MC3T3-E1 preosteoblasts attached to PCL-pRGD at different rates, which may explain the similar response than BMP-2 alone on cell differentiation when they were used in combination. The sequential stimulation with BMP-2 and BMP-9 may overcome this problem. Our findings highlight the importance of analysing the capacity of bone cells attached to biomimetic materials to respond to growth factors. This type of experimental approach is required to develop functionalized biomaterials that improve the response of bone cells to growth factors for clinical and tissue engineering applications.

4.8. Acknowledgements

We thank Dr Owen Parkes for editing the English text. This research was supported through a Research Chair of Canada (Laboratory of Cells-Biomaterials Biohybrid Systems) and a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada program.

5. CHAPITRE 5 : DISCUSSION GÉNÉRALE

Le premier contact entre le biomatériau et les cellules détermine le devenir de ces dernières. On pourrait alors définir le biomatériau comme un « premier messenger ». Les biomatériaux de 4^{ème} génération utilisés en application osseuse sont ainsi capables d'orienter la réponse cellulaire. Pour cela, leur surface peut être fonctionnalisée afin de mimer soit les protéines de l'ECM osseuse soit les composantes minérales de la matrice inorganique (Wojtowicz *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2013). Dans ce projet de doctorat, la première stratégie a été sélectionnée, le PCL étant fonctionnalisé par un peptide de 15 acides aminés dérivé de la BSP et contenant la séquence RGD. Il aurait été également possible d'incorporer de l'HAP dans le PCL permettant de conjuguer ainsi la fonctionnalisation sur le PCL et le caractère ostéoinductif de l'HAP (Chen et Chang, 2011). En effet, plusieurs équipes ont étudié cette insertion PCL-HAP et ont observé une meilleure colonisation du matériau en présence de HAP comparé au PCL seul ainsi qu'une meilleure différenciation en ostéoblaste (Chen et Chang, 2011; Wutticharoenmongkol *et al.*, 2007). Cependant l'insertion de parties inorganiques dans des matrices de polymère peut diminuer le temps de dégradation du composite ainsi obtenu (Morawska-Chochol *et al.*, 2011).

Ce projet a permis dans un premier temps de préparer et de caractériser des films de PCL biomimétiques et d'analyser leur capacité non seulement à adsorber les protéines sériques adhésives mais également à orienter le comportement des préostéoblastes en termes d'organisation des protéines du cytosquelette et de transduction du signal. Dans un deuxième temps, l'addition de la BMP-2 et/ou de la BMP-9 sur les préostéoblastes murins MC3T3-E1 adhérant aux films PCL-pRGD a mis en évidence l'influence de la fonctionnalisation sur la capacité des cellules à répondre aux facteurs de croissance et à se différencier démontrant ainsi l'importance du biomatériau « premier messenger ».

5.1. Influence des peptides d'adhésion sur le comportement de préostéoblastes MC3T3-E1

5.1.1. Méthodologie utilisée pour la fonctionnalisation des films de PCL et caractérisation de leurs propriétés de surface

Dans le cadre de ce projet de recherche qui visait à améliorer les propriétés d'interaction du PCL avec les préostéoblastes, il a été possible de synthétiser et de caractériser des films de PCL fonctionnalisés de manière covalente par des peptides pRGD (positif). Des films PCL contrôles ont été obtenus après greffage de peptides pRGE (négatif). Le simple remplacement de l'acide aminé D par E est suffisant pour bloquer la reconnaissance du peptide par les intégrines (Pierschbacher et Ruoslahti, 1984b; Hersel *et al.*, 2003). La technique de fonctionnalisation du PCL par des peptides RGD sélectionnée dans ce projet est celle déjà publiée par Sun et Öneby (2006). Bien que les quantités de réactifs utilisées aient été réduites par rapport à celles publiées (Sun et Öneby, 2006), nos résultats XPS et Sims-ToF (Figure 5.1) révèlent une fonctionnalisation du PCL par les peptides pRGD et pRGE. Une autre méthode pour vérifier cette fonctionnalisation aurait pu être utilisée. Celle-ci consiste à quantifier le groupement partant du PDEA lors de l'addition du pRGD par une spectroscopie UV-visible (Sun et Öneby, 2006). Les quantités de réactifs ont été sélectionnées afin d'atteindre une densité de peptides d'environ 0.62 pmol/cm^2 (Rezania et Healy, 2000). En effet, celle-ci a été définie par Rezania et Healy (2000) comme étant la densité optimale de peptides pRGD présents sur une surface de quartz pour induire la minéralisation de l'ECM par des cellules issues du calvaria de rat.

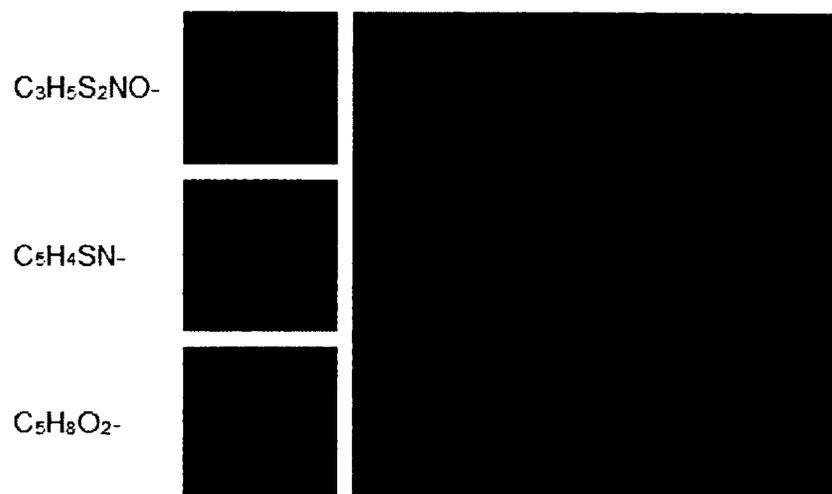


Figure 5.1 : Sims-ToF d'une surface de PCL-pRGD (image 300 x 300 μm)

De plus, les peptides pRGD et pRGE utilisés dans ce projet ont leurs extrémités C et N terminales protégées. Le choix de la fonctionnalisation a été fait afin de contrôler de façon spécifique le greffage des peptides. En effet, cette méthode de fonctionnalisation implique uniquement la fonction thiol de la cystéine et non les fonctions acide carboxylique ou amine afin de prévenir toute réaction avec les groupements des chaînes latérales des acides aminés arginine et acide aspartique/acide glutamique du pRGD et pRGE (Hersel *et al.*, 2003). Une telle interaction pourrait en effet inactiver le peptide greffé. Cependant la création de ponts disulfures (251 kJ.mol^{-1}) est 40 % moins stable que la formation d'une liaison C-C (Huheey *et al.*, 1993; Clayden *et al.*, 2001).

Il existe néanmoins d'autres méthodes afin de greffer des peptides de façon covalente sur un polymère, notamment, en utilisant un réactif contenant une fonction maléimide afin de former une liaison C-S plus stable (Houseman *et al.*, 2003). Afin de prévenir un greffage par une fonction latérale du peptide RGD, il est également possible de protéger les groupements réactifs permettant alors d'utiliser des greffages faisant intervenir les fonctions amine par exemple (Lin *et al.*, 1992). Les différentes étapes de la fonctionnalisation des films de PCL (hydrolyse, fonctionnalisation par le PDEA et la formation du pont disulfure avec le pRGD) s'accompagnent de plusieurs changements des propriétés de surface qui sont à prendre en compte dans le cadre d'une utilisation ultérieure. Par exemple, tel que mentionné dans le

paragraphe 3.5, la surface des films de PCL subit un changement d'hydrophilicité lorsque le PCL est traité par une solution d'hydroxyde de sodium, ce dernier devenant plus hydrophile. Cette modification de la surface est mise en évidence par la diminution de l'angle de contact que fait une goutte d'eau sur la surface. Les propriétés hydrophobe et hydrophile d'un matériau peuvent avoir une influence sur sa capacité d'adsorption des protéines et leur conformation (Andrade et Hlady, 1986; Collier *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2006). Ainsi, les films de PCL après hydrolyse par l'hydroxyde de sodium adsorbent les protéines adhésives fibronectine et vitronectine du sérum mais les cellules ne semblent pas capables d'interagir avec ces protéines comme le montre leur morphologie plutôt arrondie et l'absence d'organisation de leur cytosquelette d'actine. Un changement de topographie de surface pourrait également jouer un rôle dans cette adsorption non spécifique. En effet, Lee *et al.* (2006) ont montré que la modification de la topographie de surface influençait non seulement l'adsorption de la fibronectine mais également l'intensité de la force à appliquer pour détacher des cellules K562 (cellules issues d'une leucémie myéloïde chronique) de la surface. L'adsorption de la fibronectine et la force d'attachement cellulaire augmentent avec la rugosité moyenne quadratique (RMS= 1,46 Vs 0.18 nm). Cependant, dans ce projet de doctorat même si la surface des films de PCL hydrolysés semblait irrégulière en observation SEM, les analyses en AFM n'ont pas révélé de changement significatif de la rugosité de surface Ra (rugosité moyenne arithmétique) après le traitement par l'hydroxyde de sodium ainsi que la fonctionnalisation par les peptides pRGD et pRGE. Les surfaces pRGD et pRGE adsorbent également de la fibronectine et de la vitronectine présentes dans le sérum de veau fœtal. De plus, en présence de sérum, les préostéoblastes MC3T3-E1 ne distinguent pas la fonctionnalisation du PCL par le peptide pRGD ou le pRGE. Un étalement des préostéoblastes non significativement différent est observé au contact de ces deux peptides positif et négatif. Les protéines présentes dans le sérum masquent donc totalement la fonctionnalité de la surface.

Dans le cadre d'une application des films de PCL avec une implantation directe chez le patient, cet aspect adsorption non spécifique des protéines pourrait être problématique. Cependant, dans une approche portée sur l'ingénierie tissulaire, stratégie privilégiée dans cette étude, qui implique une pré-colonisation du matériau par les cellules du patient *in vitro* en absence de sérum avant implantation, une telle surface donne des résultats prometteurs. En

effet, en ingénierie tissulaire, la composition du milieu de culture est définie, l'utilisation de sérum étant à éviter tel que recommandé par la FDA (FDA, 1993).

5.1.2. Différence d'organisation des protéines du cytosquelette dans les préostéoblastes en fonction des peptides utilisés

La fonctionnalisation par des peptides d'adhésion a pour but de favoriser les interactions entre une surface et les cellules présentes dans le milieu de culture (*in vitro*). En effet, plusieurs études, dont celle présentée dans le paragraphe 3.5.4, ont permis de démontrer que des préostéoblastes murins ou des cellules souches mésenchymateuses de rat organisent leur cytosquelette d'actine lorsqu'ils adhèrent à des matériaux sur lesquels sont greffés des peptides d'adhésion comportant la séquence RGD (Drevelle *et al.*, 2010; Marquis *et al.*, 2008; Zhang et Hollister, 2009; Marletta *et al.*, 2005). Par contre, la plupart de ces études n'utilisent pas de peptides négatifs contrôles. En effet, Zhang et Hollister (2009) ont observé un effet positif du greffage du peptide RGDC sur PCL par rapport au PCL non traité en termes d'organisation du cytosquelette. Cependant, ils n'ont pas corroboré ce résultat avec un peptide négatif. Leurs expérimentations étant menées en présence de protéines sériques (10 % FBS), il aurait été intéressant de déterminer leur influence sur le comportement cellulaire observé en utilisant ce type de contrôle.

En absence de sérum, les films PCL-pRGD, contrairement aux surfaces PCL-pRGE, permettent la formation des points focaux et l'organisation du cytosquelette d'actine dans les préostéoblastes MC3T3-E1 qui sont à leur contact. De plus cette fonctionnalisation du PCL par le peptide positif ou le peptide négatif induit une différence de signalisation intégrines mise en évidence par l'état d'autophosphorylation de la FAK (Figure 5.2). Les surfaces PCL-pRGD permettent une activation de la FAK sur la tyrosine 397, premier pas vers une activation totale de la FAK, notamment l'activation de la tyrosine 925 qui permet l'organisation des points focaux *via* la taline et la paxilline (Schlaepfer et Hunter, 1996).

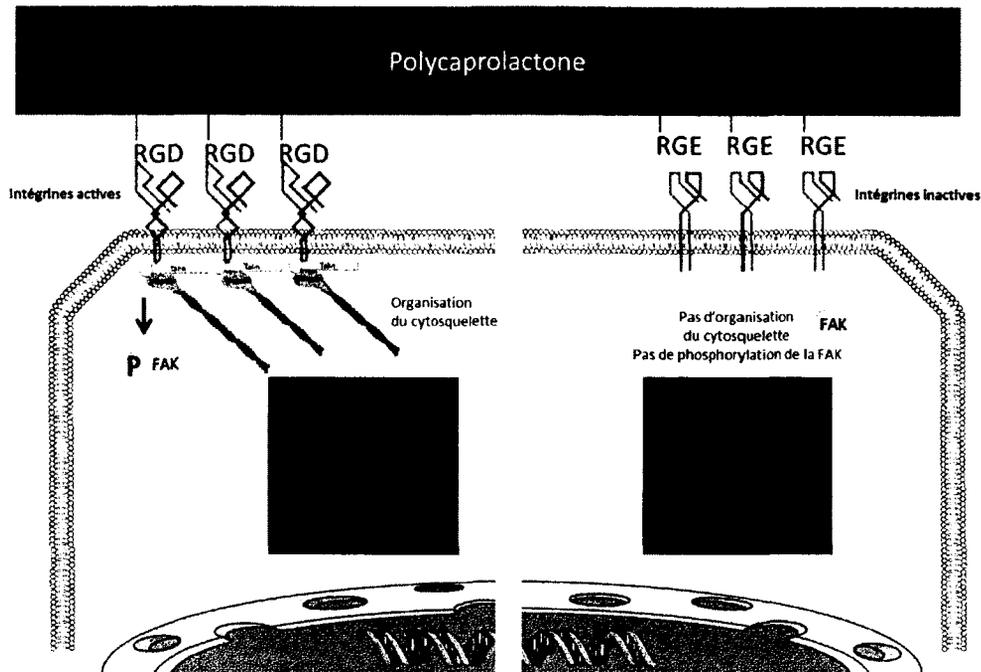


Figure 5.2 : Effet des peptides pRGD et pRGE sur la capacité des préostéoblastes murins à organiser les protéines du cytosquelette et à activer la FAK

5.1.3. La présence de peptides d'adhésion est nécessaire à la réponse des préostéoblastes murins à la BMP-2

Quelques études ont démontré l'existence d'interactions croisées entre les intégrines, notamment $\alpha_v\beta_3$ et la BMP-2 ou leurs peptides dérivés (pBMP-9), aussi bien en termes de localisation des récepteurs des BMPs que d'expression des intégrines membranaires (Lai et Cheng, 2005; Marquis *et al.*, 2008). Dans le cadre de ce projet de doctorat, nous avons donc choisi d'utiliser le peptide pRGD sur une surface de PCL afin d'obtenir une synergie entre la BMP-2 et l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Seuls les préostéoblastes murins MC3T3-E1 adhérents aux films de PCL-pRGD présentent une augmentation de l'état de phosphorylation des Smad1/5/8 en présence de BMP-2, le pRGE n'ayant aucun effet (Drevelle *et al.*, 2010). De même, ces cellules adhérentes au PCL-pRGD présentent un état de phosphorylation de la Tyr397, signal provenant des intégrines. Or, l'utilisation d'ARNm anti-sens FAK dans des préostéoblastes murins MC3T3-E1 a permis d'identifier que cette protéine est nécessaire à leur différenciation en ostéoblastes matures en présence de BMP-2 (100 ng/mL) (Tamura *et al.*, 2001). L'absence

d'activité sur la surface pRGE de la FAK pourrait ainsi expliquer l'absence d'augmentation de la phosphorylation des Smad1/5/8 en présence de la BMP-2.

Ainsi, le film PCL-pRGE utilisé comme contrôle négatif a permis de démontrer l'efficacité du PCL-pRGD en absence de sérum, autant au niveau de l'organisation du cytosquelette (organisation des points focaux avec la vinculine et formation des fibres d'actine) que des signalisations intégrines et BMP (FAK, activation de la voie des Smads) (Drevelle *et al.*, 2010). Cependant les essais à plus long terme ont montré une diminution importante du nombre de cellules sur les films PCL-pRGE (Drevelle *et al.*, 2013); ces dernières, ne pouvant adhérer et s'étaler, elles vont donc progressivement se détacher et mourir.

5.2. Comment mimer le vivant afin d'obtenir une meilleure différenciation osseuse

5.2.1. La stimulation des préostéoblastes adhérant au PCL-pRGD par la BMP-2 et la BMP-9 induit des cinétiques de phosphorylation des Smads et de stabilisation de la β -caténine différentes

L'utilisation de la BMP-2 et de la BMP-9 semble être une avenue intéressante à étudier, la BMP-2 étant actuellement utilisée dans des systèmes commerciaux pour des applications de réparation osseuse et la BMP-9 ayant une plus grande aptitude à induire la différenciation de cellules C2C12 (myoblastes) en ostéoblastes par rapport à la BMP-2 (Kang *et al.*, 2004). De plus, ces deux BMPs sont issues de deux sous-familles différentes. La BMP-2 et la BMP-9 utilisent des récepteurs de type I différents. En effet la BMP-2 utilise ALK3 et ALK6 tandis que la BMP-9 utilise ALK1 et ALK2.

Néanmoins, très peu d'études ont analysé l'influence des peptides d'adhésion sur la réponse cellulaire à la BMP-2 (Smith *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2011). Par exemple, la BMP-2 a été utilisée conjointement avec un peptide constitué uniquement de la séquence RGD greffé sur un polymère de PLGA dans lequel sont incorporées des particules de HAP (HAP-PLGA-RGD) (Zhang *et al.*, 2011). Après 7 jours d'incubation, une meilleure prolifération des ostéoblastes extraits du calvaria de lapin a été observée sur les matériaux HAP-PLGA-RGD

par rapport à HAP-PLGA. De plus, l'utilisation *in vivo* d'une architecture 3D de HAP-PLGA-RGD en combinaison avec de la BMP-2 (0,4 % en masse) permet une meilleure réparation osseuse dans des radius de lapin après 24 semaines par rapport au HAP-PLGA-RGD seul (Zhang *et al.*, 2011).

D'autre part, une seule étude a, à notre connaissance, été réalisée récemment en utilisant des cellules endothéliales adhérant à certains domaines de la protéine adhésive fibronectine et stimulées par la BMP-9 (Tian *et al.*, 2012).

L'influence du PCL-pRGD sur la réponse des préostéoblastes murins à la BMP-2 et/ou BMP-9 a donc été analysée dans le cadre de ce projet de doctorat. Si les résultats obtenus *in vitro* avec des préostéoblastes murins attachés au PS et stimulés par la BMP-2 ou la BMP-9 montrent une signalisation similaire en termes de phosphorylation des Smad1/5/8 (Bergeron *et al.*, 2009), la signalisation induite lorsque ces cellules adhèrent au PCL-pRGD est fonction de la BMP utilisée. En effet, un retard de la phosphorylation des Smad1/5/8 (détectée à 4h) est observé avec la BMP-9 par rapport à la BMP-2 qui active ces Smads dès 30 min (Drevelle *et al.*, 2013). Une autre différence réside dans les niveaux de β -caténine, protéine impliquée dans la voie canonique des Wnts. En effet, tandis que l'addition de la BMP-2 semble stabiliser le niveau de β -caténine, cette protéine n'est plus détectée après 6 h dans les cellules incubées en présence de la BMP-9 (Drevelle *et al.*, 2013). La phosphorylation des Smads1/5/8 par la BMP-9 semble donc concomitante avec une diminution de la β -caténine.

Ces résultats sont pour le moins surprenants puisque la différenciation de cellules souches de souris C3H10T1/2 en ostéoblastes matures après leur transfection par un adénovirus codant pour la BMP-9 est accentuée par l'activation de la voie canonique des Wnts par la Wnt3a (Tang *et al.*, 2009). D'autres études corroborent un effet croisé de la voie des Wnts et de celle des BMPs. En effet Zhang *et al.* (2013) ont également démontré que la voie des Wnts canonique induisait *via* la β -caténine l'expression du gène codant pour la BMP-2 dans les myoblastes C2C12. Cependant, la BMP-2 (100 ng/mL) après 3 h de stimulation peut induire la synthèse d'ARNm codant pour DKK1, un inhibiteur du récepteur de la voie Wnt canonique LRP5/6 dans les ostéoblastes matures (Kamiya *et al.*, 2010b). Le même phénomène est observable avec l'utilisation d'une forte dose de BMP-2 (2 000 ng/mL) dans des ostéoblastes extraits du périoste (Kim *et al.*, 2013).

D'autres voies de signalisation comme celles des MAPKs peuvent également être induites par les BMPs et influencer la réponse cellulaire. L'activation de la MAPK p38 est ainsi indispensable à la différenciation des préostéoblastes MC3T3-E1 en ostéoblastes matures en présence de BMP-2 (Guicheux *et al.*, 2003). Cet effet a également été observé pour des cellules souches de rat issues du follicule dentaire et transfectées par un adénovirus codant pour la BMP-9 (Li *et al.*, 2012). L'influence des ERK1/2 sur la différenciation ostéogénique reste par contre un peu plus controversée. Une fois phosphorylée, ERK1/2 peut bloquer la translocation du complexe Smad1/5/8-Co-Smad vers le noyau et ainsi empêcher la transcription des gènes codant pour des protéines impliquées dans la différenciation ostéogénique tel MSX2 (Msh homeobox 2), l'ostéopontine ou l'ALP dans les cellules souches humaines (Osyczka et Leboy, 2005). Cependant, Jun *et al.* (2010) ont montré qu'une stimulation des myoblastes C2C12 par la BMP-2 (200 ng/mL) stabilisait Runx2, facteur de transcription utilisé comme marqueur de différenciation ostéoblastique par l'intermédiaire de l'activation de ERK1/2. Cependant, dans ce travail de doctorat, les cinétiques d'activation des MAPK ERK1/2, p38 et JNK par la BMP-2 ou la BMP-9 sont similaires dans les préostéoblastes MC3T3-E1 adhérant au PCL-pRGD.

La différence de signalisation Smad observée entre la BMP-2 et la BMP-9 dans les préostéoblastes adhérant au PCL-pRGD semble se répercuter sur leur différenciation (Figure 5.3). Sur les surfaces PCL-pRGD, une quantité inférieure d'ARNm codant pour les marqueurs de différenciation ostéoblastique tels *Osx* (24h) et *OC* (72h) est observée dans les cellules stimulées par la BMP-9 par rapport à la BMP-2 à 0,38 nM (Drevelle *et al.*, 2013).

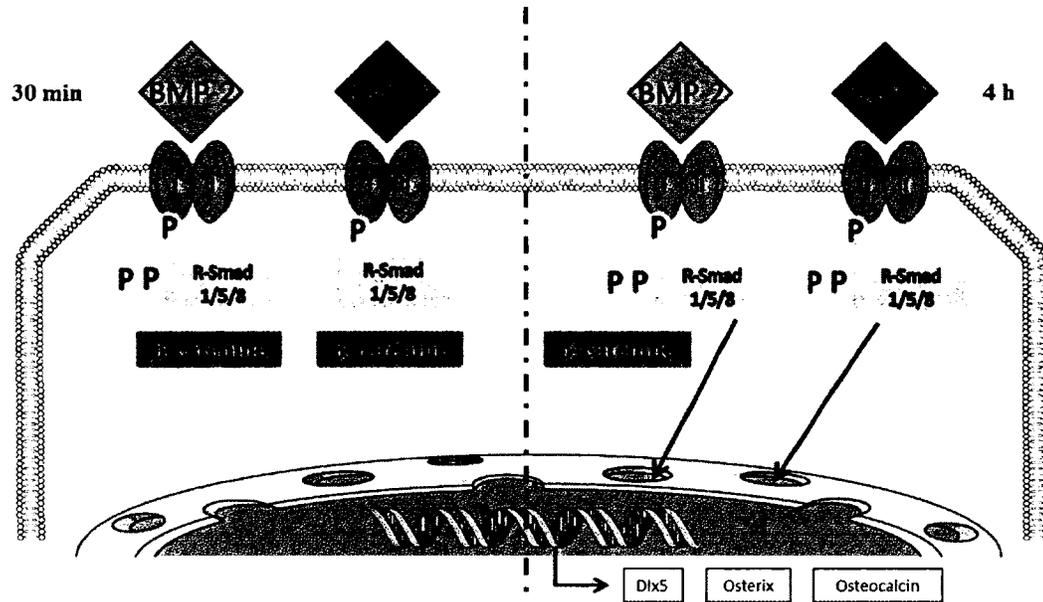


Figure 5.3 : Signalisation intracellulaire induite par la BMP-2 et la BMP-9 dans les préostéoblastes murins adhérant aux films de PCL-pRGD

5.2.2. La stimulation des préostéoblastes adhérant au PCL-pRGD par l'addition simultanée des BMP-2 et BMP-9 induit une différenciation cellulaire comparable à celle de la BMP-2 seule

Durant les différentes phases du processus de régénération osseuse, plusieurs facteurs de croissance et cytokines (IL-6, BMPs, TGF- β , VEGFs) interviennent (Al-Aql *et al.*, 2008). La BMP-2 est nécessaire dans l'ensemble des phases du processus de réparation, les autres facteurs de croissance et cytokines n'étant nécessaires qu'à certains moments (Al-Aql *et al.*, 2008). De plus, il a récemment été montré que la BMP-9, qui est un facteur circulant dans le plasma à une concentration de 2 à 12 ng/mL, est également présente dans les plaquettes (Bidart *et al.*, 2012; Osada *et al.*, 2012). Or, les plaquettes étant parmi les premiers intervenants lors du processus de réparation de fracture osseuse pendant la phase hématome et formation du clou plaquettaire, il est possible que leur dégranulation libère de la BMP-9. Une telle hypothèse n'a néanmoins pas encore été vérifiée *in vivo*.

Afin d'optimiser la différenciation des préostéoblastes en ostéoblastes au contact du PCL-pRGD, une stimulation simultanée par la BMP-2 et la BMP-9 semblait prometteuse.

Cependant, l'utilisation en combinaison de la BMP-2 et de la BMP-9 montre des niveaux d'ARNm codant pour Osx et OC comparables à ceux générés par la BMP-2 seule. La signalisation au niveau de la phosphorylation des Smads et de la β -caténine en présence de BMP-2 et BMP-9 est également assez similaire à celle observée avec la BMP-2 seule malgré une légère diminution de la phosphorylation des Smads à 4 h, ce qui pourrait expliquer les niveaux d'ARNm codant pour Osx observés. Ces résultats suggèrent que la BMP-2 et la BMP-9 impliquent une signalisation antagoniste dans les cellules adhérant au PCL-pRGD expliquant ainsi l'absence d'effet additif ou synergique de ces molécules. Le problème rencontré ici se situe alors au niveau du décryptage des voies empruntées par la BMP-2 et la BMP-9. En effet, les interactions entre les intégrines, notamment $\alpha_v\beta_3$, et les récepteurs de la BMP-2 ont été mises en évidence.

En ce qui concerne la BMP-9, les études sont un peu plus rares en partie à cause de sa découverte plus récente (Celeste *et al.*, 1994). Ainsi les interactions entre les intégrines et les récepteurs de type I de la BMP-9 n'ont pas été étudiées.

De plus, le mode d'action de la BMP-9 au niveau des récepteurs membranaires ou de co-stimulateurs n'est pas encore complètement compris.

Hu *et al.* (2012) ont montré que la stimulation des cellules souches C3H10T1/2 par la BMP-9 est également potentialisée par HIF1 α (hypoxia-inducible factor 1 α) (Hu *et al.*, 2012). HIF1 α apparaît notamment lors du phénomène d'hypoxie (diminution de l'oxygène présent) qui pourrait apparaître lors du trauma et de la rupture des vaisseaux (Zhang *et al.*, 2012a; Chen *et al.*, 2012). Des coopérations entre les récepteurs BMP-9 (ALK1) avec d'autres récepteurs comme l'endogline (CD105) (Tian *et al.*, 2012) confirmeraient un mode d'action différent de la BMP-9 par rapport à la BMP-2. De plus, le principal gène activé en présence de BMP-9 (adénovirus) dans les C3H10T1/2 code pour Hey-1 (Sharff *et al.*, 2009) qui intervient notamment dans la signalisation Notch. L'utilisation de petit ARN interférents (siRNA) afin de bloquer Hey1 dans les cellules C3H10T1/2 incubées en présence de la BMP-9 engendre une diminution de leur différenciation (mis en évidence en mesurant l'activité de l'ALP) en ostéoblastes après 7 et 10 jours (Sharff *et al.*, 2009).

Il est donc primordial d'étudier l'ensemble des interactions récepteurs-intégrines et BMP-9 afin de mieux comprendre le mode d'action de la BMP-9.

6. CHAPITRE 6 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES

6.1. Conclusion

Tout d'abord ce projet de doctorat a permis de fonctionnaliser un film PCL par un peptide d'adhésion pRGD *via* une cystéine et d'étudier son influence sur la réponse de préostéoblastes murins MC3T3-E1 à la BMP-2. Si, en absence de sérum, l'auto-activation de la FAK et la stimulation de la voie canonique des Smads par la BMP-2 ont uniquement été observées dans les cellules adhérant au PCL-pRGD, ce projet de doctorat a néanmoins montré comment les protéines adhésives contenues dans le sérum pouvaient complètement masquer l'effet de cette fonctionnalisation en termes d'organisation du cytosquelette. Les résultats obtenus avec les pRGD et pRGE sont en effet dans ce cas similaires. Cette étude rappelle donc l'importance d'utiliser des peptides négatifs contrôles (pRGE) qui sont pourtant souvent négligés dans la littérature. L'absence d'activation des Smads dans les préostéoblastes MC3T3-E1 au contact du PCL-pRGE semblent confirmer le rôle clé des intégrines, dont $\alpha_v\beta$, dans la réponse cellulaire à la BMP-2. Malheureusement, les peptides négatifs ne sont pas utilisables pour des expériences à long terme, la survie des préostéoblastes étant drastiquement affectées.

Dans un deuxième temps, ce projet a montré que les activations des voies Smad et Wnt canonique dans les préostéoblastes adhérant au PCL-pRGD en présence de BMP-2 et BMP-9 étaient très différentes. Ces résultats suggèrent que la BMP-2 et la BMP-9, issues de deux sous-familles de BMP, ne font pas intervenir les mêmes régulations dans les préostéoblastes MC3T3-E1 au contact de films PCL-pRGD. Ainsi, la différenciation des préostéoblastes induite par la co-stimulation BMP-2 et BMP-9 s'avère décevante par rapport à l'utilisation de BMP-2 seule.

L'étude menée dans ce projet met donc en avant l'importance des choix à faire en termes de fonctionnalisation et de stimulation par des facteurs de croissance. En effet, la

fonctionnalisation peut induire une signalisation contradictoire par différents BMPs. Il est donc important de quantifier chaque phénomène avant l'utilisation finale aussi bien en ingénierie tissulaire que dans le cadre d'implantation de biomatériaux.

En conclusion, les résultats obtenus dans ce projet ont permis d'acquérir une meilleure compréhension des événements biochimiques impliqués lors de l'utilisation des BMPs en combinaison avec un biomatériau fonctionnalisé par des peptides d'adhésion. Cependant, cette étude utilise des cellules qui sont déjà orientées dans la lignée ostéogénique. Il serait alors fort intéressant à plus long terme de déterminer quelles sont les répercussions d'un tel système sur les cellules souches mésenchymateuses.

6.2. Perspectives

Ce projet de doctorat avait comme principal objectif de mieux comprendre l'influence d'un matériau fonctionnalisé par des peptides d'adhésion sur la réponse cellulaire aux BMPs et plus précisément à la BMP-2 et à la BMP-9. Cependant cette étude ouvre un certain nombre d'interrogations et le système demande certaines améliorations.

6.2.1. Favoriser l'interaction cellule/PCL-pRGD

Un point important dans le cadre des surfaces fonctionnalisées est la densité des peptides qui peut jouer sur l'adhésion, la prolifération et la différenciation des cellules au contact du matériau. Par exemple, la prolifération des préostéoblastes MC3T3-E1 dépend de la densité de peptides présents sur la surface alors que les cellules souches murines (cellule D1) sont moins affectées (Hsiong *et al.*, 2008). Il sera donc important de quantifier la densité de peptides présents à la surface du PCL dans notre système. Afin de déterminer la concentration en pRGD, il est possible de marquer le peptide avec un agent radioactif ou fluorescent et de comparer les résultats obtenus avec un standard. Il est également possible de quantifier le groupement PDEA partant lors du greffage du pRGD par détection de la fluorescence ou en UV-visible. Des essais préliminaires en fluorescence n'ont pas permis de déterminer avec précision la densité de pRGD sur le PCL, les quantités de peptides sur la surface étant très faibles (environ 1 pmol/cm²).

Dans un second temps, nous avons vu que l'adsorption protéique non spécifique sur le film de PCL pouvait être problématique. En effet la fonctionnalisation par le pRGD et celle par le pRGE induisent la même organisation du cytosquelette d'actine des préostéoblastes MC3T3-E1 en présence de sérum. Pour permettre une utilisation directe du matériau fonctionnalisé *in vivo* il devient indispensable de prévenir cette adsorption protéique non spécifique.

L'utilisation de polymères comme le PEG peut alors être envisagée (Lee *et al.*, 2013). Michel *et al.* (2005) ont ainsi montré que la densité du PEG est un facteur dominant dans la prévention de l'adsorption non spécifique des protéines. La fonctionnalisation d'une surface de pentoxyde de niobium avec un copolymère de poly(L-lysine)-g-PEG (PLL-g-PEG) a montré que plus la quantité de PEG est importante dans le copolymère PLL-g-PEG moins ce dernier adsorbe les protéines à sa surface (Michel *et al.*, 2005). De plus, la longueur de chaîne du PEG est également un facteur important sur les phénomènes d'adsorption protéique. Plus les chaînes de PEG sont longues ($400 < M_n < 2000$ g/mol) moins le polyuréthane fonctionnalisé par ces chaînes adsorbe de protéines à sa surface (Chen *et al.*, 2008).

6.2.2. Favoriser les interactions intégrines/BMP

Ce projet a mis en avant une différence de signalisation entre la BMP-2 et la BMP-9 sur une surface utilisant un peptide d'adhésion interagissant avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Décrypter l'interaction des récepteurs intégrines avec ceux de la BMP-9 est le point le plus important afin de mieux comprendre comment la BMP-9 interagit avec la cellule afin d'accroître l'efficacité des futurs matériaux fonctionnalisés. Il pourrait être alors intéressant de tester l'interaction de la BMP-9 avec une autre intégrine, notamment l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ spécifique de la fibronectine. En effet, Tian *et al.* (2012) ont observé sur les cellules endothéliales que la fibronectine, par l'intermédiaire de ses interactions avec les intégrines $\alpha_5\beta_1$, permettait une meilleure signalisation de la BMP-9 *via* une augmentation de la phosphorylation des Smad1/5/8 par rapport à la BMP-9 en présence de collagène seule. Une autre alternative serait l'utilisation de séquences d'acides aminés mimant plusieurs sites d'adhésion avec les intégrines et permettant une meilleure interaction sur la surface PCL. En effet, les protéines de l'ECM possèdent plusieurs sites actifs. Par exemple, la fibronectine implique les deux séquences RGD et PHRSN lors de son interaction avec l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ (Redick *et al.*, 2000).

6.2.3. Comprendre les interactions Wnt/BMP

Dans les préostéoblastes MC3T3-E1 adhérant au PCL-pRGD, une différence importante entre la signalisation intracellulaire de la BMP-2 et la BMP-9 est apparue : en présence de BMP-9, la β -caténine disparaît progressivement tandis que la phosphorylation des Smad1/5/8 débute. Afin d'étudier l'influence de la β -caténine sur l'action de la BMP-9, une stimulation des cellules par Wnt3a (100 ng/mL) a été utilisée (Figure 6.1).

Les immunobuvardages de type western révèlent que les préostéoblastes murins adhérant au PCL-pRGD et stimulés par la BMP-9 pendant 3h puis traités par la Wnt3a possèdent encore de la β -caténine (Figure 6.1.). L'ajout de Wnt3a a donc partiellement inhibé la dégradation de la protéine induite par le traitement des cellules par la BMP-9.

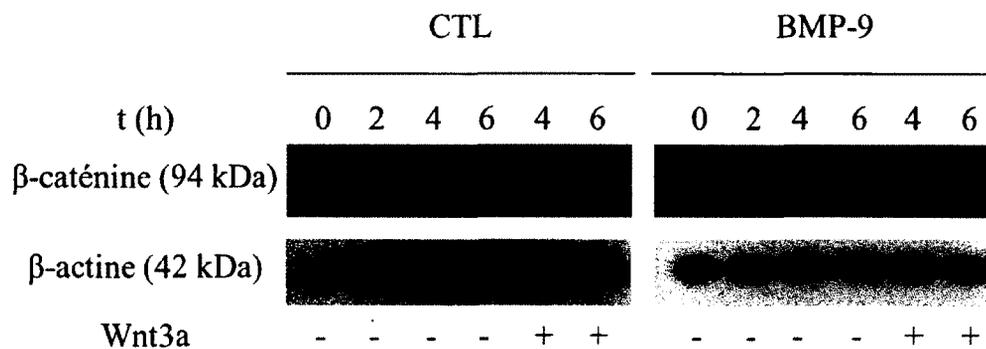


Figure 6.1 : Cinétique de signalisation de la β -caténine en présence d'une stimulation par Wnt3a (100 ng/mL) 3h après une stimulation par la BMP-9

De plus, l'addition de 100 ng/mL de Wnt3a 3 h après la stimulation par la BMP-9 induit une diminution de l'expression du gène codant pour Dlx5 à 6h dans les préostéoblastes adhérant au PCL-pRGD (Figure 6.2).

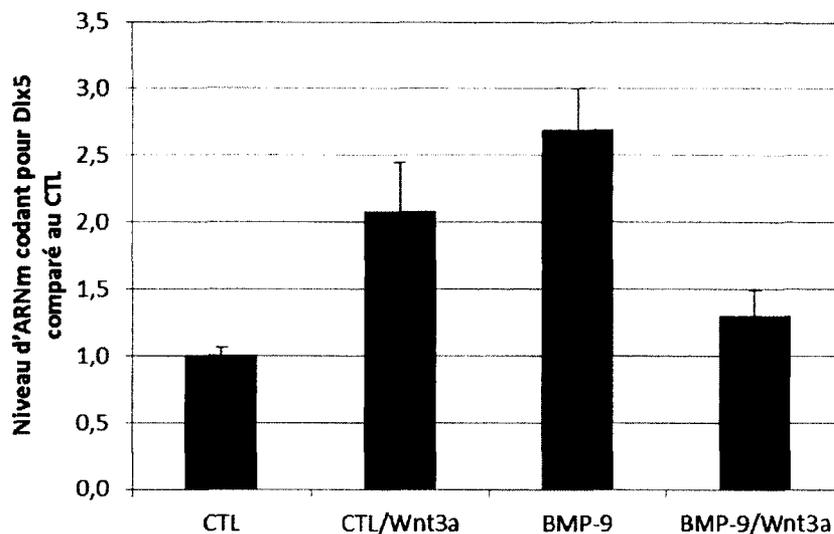


Figure 6.2 : Expression de l'ARNm codant pour Dlx5 par rapport au CTL 6h après la stimulation par la BMP-9 (ajout de Wnt3a décalé de 3h)

Cependant, la stimulation par Wnt3a peut ne pas uniquement activer la voie Wnt canonique mais peut également activer la voie non canonique (Qu *et al.*, 2013). En effet Qu *et al.* (2013) ont montré que, dans les cellules souches extraites de rats Sprague-Dawley, l'utilisation de lentivirus permettant l'expression de Wnt3a induisait non seulement l'augmentation de la β -caténine mais également la phosphorylation de CaMKII intervenant dans la voie Wnt non-canonique. Il serait alors important d'analyser dans ce projet l'effet d'inhibiteurs spécifiques de la voie canonique des Wnts comme Dkk1 qui va entrer en compétition avec Wnt3a au niveau des récepteurs LRP5/6 sur l'activité transcriptionnelle de Dlx5. Cette approche expérimentale permettrait de vérifier si l'inhibition induite par Wnt3a est réalisée *via* la voie Wnt canonique.

6.2.4. Stimulation séquentielle des cellules adhérentes au PCL-pRGD par la BMP-2 et la BMP-9

L'utilisation simultanée de la BMP-2 et de la BMP-9 a induit une activité ALP similaire à celle de la BMP-2 seule vraisemblablement en raison de signalisations

intracellulaires BMP-2/BMP-9 antagonistes. L'activation séquentielle des cellules par la BMP-2 et la BMP-9 serait une stratégie alternative. Cependant, les résultats préliminaires n'ont donné aucun effet concluant. Dans tous les cas, la stimulation décalée dans le temps (seulement 2h30) BMP-2 puis BMP-9 ou BMP-9 puis BMP-2 donnait des résultats très similaires à ceux obtenus avec la BMP-2 seule. Il s'avère donc nécessaire d'effectuer une étude cinétique complète.

Finale,ment, ce projet a utilisé des protéines recombinantes humaines BMP-2 et BMP-9. Or, des peptides dérivés de l'épitope knuckle de la BMP-9 utilisés seuls ou en combinaison avec un système de libération ont montré des résultats très prometteurs tant *in vitro* qu'*in vivo* (Bergeron *et al.*, 2009 et 2012). De même, He *et al.* (2008) ont réalisé un hydrogel contenant le peptide GRGD (1,62 pmol/cm²) et un peptide dérivé de la BMP-2 (5 pmol/cm²). Ils ont observé, dans les cellules souches mésenchymateuses isolées à partir de rat (Wistar) et incubées 14 jours dans l'hydrogel contenant le peptide GRGD et le peptide issu de la BMP-2, une activité de l'ALP supérieure à celles observées dans les cellules des hydrogels contenant uniquement GRGD ou le peptide dérivé de la BMP-2.

De plus, He *et al.* (2012) ont récemment inclus un peptide issu de l'ostéopontine dans ces hydrogels fonctionnalisés par GRGD et le peptide dérivé de la BMP-2. Après 14 jours de culture, l'ajout du peptide issu de l'ostéopontine induit une augmentation de l'activité de l'ALP dans les cellules souches mésenchymateuses de rat par rapport à l'hydrogel contenant le GRGD et le peptide dérivé de la BMP-2 (He *et al.*, 2012). Il serait alors intéressant de conjuguer à plus long terme les deux stratégies, combiner l'action des peptides extraits de protéines de l'ECM avec les peptides dérivés des BMPs, peptides moins dispendieux que les protéines recombinantes humaines.

Références :

- Agence de la santé publique du Canada (2009). Quel est l'impact de l'ostéoporose au Canada et que font les Canadiens pour veiller à la santé de leurs os? 4 pages
- Ajami-Henriquez, D., Rodriguez, M., Sabino, M., Castillo, R. V., Müller, A. J., Boschetti-de-Fierro, A., Abetz, C., Abetz, V., Dubois, P. (2008). Evaluation of cell affinity on poly(L-lactide) and poly(ϵ -caprolactone) blends and on PLLA-b-PCL diblock copolymer surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 87A, p. 405-417
- Al-Aql, Z. S., Alagl, A. S., Graves, D. T., Gerstenfeld, L. C., Einhorn, T. A. (2008). Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *Journal of Dental Research*, Vol. 87, p. 107-118
- Alford, A. I., Hankenson, K. D. (2006). Matricellular proteins: Extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration. *Bone*, Vol. 38, p. 749-757
- Amato, I., Ciapetti, G., Pagani, S., Marletta, G., Satriano, C., Baldini, N., Granchi, D. (2007). Expression of cell adhesion receptors in human osteoblasts cultured on biofunctionalized poly-(ϵ -caprolactone) surfaces. *Biomaterials*, Vol. 28, p. 3668-3678
- Amin, N., Vincan, E. (2012). The Wnt signaling pathways and cell adhesion. *Frontiers in Bioscience*, Vol. 17, p. 784-804
- Andersen, T. L., del Carmen Ovejero, M., Kirkegaard, T., Lenhard, T., Foged, N. T., Delaissé, J. M. (2004). A scrutiny of matrix metalloproteinases in osteoclasts: evidence for heterogeneity and for the presence of MMPs synthesized by other cells. *Bone*, Vol. 35, p. 1107-1119
- Anderson, H. C. (2003). Matrix vesicles and calcification. *Current Rheumatology Report*, Vol. 5, p. 222-226
- Andrade, J. D., Hlady, V. (1986). Protein adsorption and materials biocompatibility : a tutorial review and suggested hypotheses. *Advances in Polymer Science*, Vol. 79, p. 1-63

- Aono, A., Hazama, M., Notoya, K., Taketomi, S., Yamasaki, H., Tsukuda, R., Sasaki, S., Fujisawa, Y. (1995). Potent ectopic bone-inducing activity of bone morphogenetic protein-4/7 heterodimer. *Biochemical Biophysical Research Communications*, Vol. 210, p. 670-677
- Arrington, E., Smith, W., Chambers, H., Bucknell, A., Davino, N. (1996). Complications of Iliac crest bone graft harvesting. *Clinical Orthopaedics & Related Research*, Vol. 329, p. 300-309
- Barber, T. A., Gamble, L. J., Castner, D. G., Healy, K. E. (2006). In vitro characterization of peptide-modified p(AAm-co-EG/AAc) IPN-coated titanium implants. *Journal of Orthopaedic Research*, Vol. 24, p. 1366-1376
- Baron, R., Neff, L., Louvard, D., Courtoy, P. J. (1985). Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-kD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border. *Journal of Cell Biology*, Vol. 101, p. 2210-2222
- Baron, R., Kneissel, M. (2013). Wnt signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nature Medicine*, Vol. 19, p. 179-192
- Bell, R., Desai, S., House, H., O'Donovan, T., Palmer, A. K. (2011). A retrospective multicenter study of the Artelon® carpometacarpal joint implant. *Hand*, Vol. 6, p. 364-372
- Bergeron, E., Senta, H., Mailloux, M., Park, H., Lord, E., Fauchoux, N. (2009). Murine preosteoblast differentiation induced by a peptide derived from bone morphogenetic proteins-9. *Tissue Engineering Part A*, Vol. 15A, p. 3341-3349
- Bergeron, E., Leblanc, E., Drevelle, O., Giguère, R., Beauvais, S., Grenier, G., Fauchoux, N. (2012). The evaluation of ectopic bone formation induced by delivery systems for bone morphogenetic protein-9 or its derived peptide. *Tissue Engineering Part A*, Vol. 18A, p. 342-352

- Bessa, P. C., Casal, M., Reis, R.L. (2008). Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts). *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Vol. 2, p. 1-13
- Bi, Y., Nielsen, K. L., Kilts, T. M., Yoon, A., Karsdal, M. A., Wimer, H. F., Greenfield, E. M., Heegaard, A. M., Young, M. F. (2006). Biglycan deficiency increases osteoclast differentiation and activity due to defective osteoblasts. *Bone*, Vol. 38, p. 778-786
- Bidart, M., Ricard, N., Levet, S., Samson, M., Mallet, C., David, L., Subileau, M., Tillet, E., Feige, J.-J., Bailly, S. (2012). BMP9 is produced by hepatocytes and circulates mainly in an active mature form complexed to its prodomain. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 69, p. 313-324
- Bonewald, L. F. (2007). Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Annals of the New York Academy Sciences*, Vol. 1116, p. 281-290
- Boyden L. M., Mao, J., Belski, J., Mitzner, L., Farhi, A., Mitnick, M. A., Wu, D., Insogna, K., Lifton, R. P. (2002). High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *New England Journal of Medicine*, Vol. 346, p. 1513-1521
- Boyle, W. J., Simonet, W. S., Lacey, D. L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, Vol. 423, p. 337-342
- Brakebusch, C., Fässler, R. (2003). The integrin-actin connection, an eternal love affair. *European Molecular Biology Organization Journal*, Vol. 22, p. 2324-2333
- Bruno, R. J., Cohen, M. S., Berzins, A., Sumner, D. R. (2001). Bone graft harvesting from the distal radius, olecranon, and iliac crest: A quantitative analysis. *Journal of Hand Surgery*, Vol. 26, p. 135-141
- Burkus, J. K., Gornet, M. F., Dickman, C. A., Zdeblick, T. A. (2002). Anterior lumbar interbody fusion using rhBMP-2 with tapered interbody cages. *Journal of Spinal Disorders & Techniques*, Vol. 15, p. 337-349

- Burkus, J. K., Heim, S. E., Gornet, M. F., Zdeblick, T. A. (2004). The effectiveness of rhBMP-2 in replacing autograft: an integrated analysis of three human spine studies. *Orthopedics*, Vol. 27, p. 723-728
- Campbell, I. D., Humphries, M. J. (2011). Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, Vol. 3, p. a004994
- Cariou, J. L., Bey, E. (2000). La vascularisation osseuse. Considérations anatomiques et physiologiques, déductions chirurgicales quant aux ostéosynthèses et lambeaux libres osseux revascularisés. *Annales de Chirurgie Plastique et Esthétique*, Vol.45, p.191-200
- Causa, F., Battista, E., Della Moglie, R., Guarnieri, D., Iannone, M., Netti, P. A. (2010). Surface investigation on biomimetic materials to control cell adhesion: The case of RGD conjugation on PCL. *Langmuir*, Vol. 26, p. 9875-9884
- Celeste, A. J., Song, J. J., Cox, K., Rosen, V., Wozney, J. M. (1994). Bone morphogenetic protein-9, a new member of the TGF- β superfamily. *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol. 9, p. S136
- Chen, H. C., Appeddu, P. A., Parsons, J. T., Hildebrand, J. D., Schaller, M. D., Guan, J. L. (1995). Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 270, p. 16995-16999
- Chen, F., Zhou, Y., Barnabas, S.T., Woodruff, M.A., Hutmacher, D.W. (2007). Engineering tubular bone constructs. *Journal of Biomechanics*, Vol. 40, p. S73-S79
- Chen, H., Hu, X., Zhang, Y., Li, D., Wu, Z., Zhang, T. (2008). Effect of chain density and conformation on protein adsorption at PEG-grafted polyurethane surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 61, p. 237-243
- Chen, J. P., Chang, Y. S. (2011). Preparation and characterization of composite nanofibers of polycaprolactone and nanohydroxyapatite for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*, Vol. 86, p. 169-175
- Chen, D., Tian, W., Li, Y., Tang, W., Zhang, C. (2012). Osteoblast-specific transcription factor Osterix (Osx) and HIF-1 α cooperatively regulate gene expression of vascular

endothelial growth factor (VEGF). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 424, p. 176-181

Cheng, H., Jiang, W., Phillips, F. M., Haydon, R. C., Peng, Y., Zhou, L., Luu, H. H., An, N., Breyer, B., Vanichakarn, P., Szatkowski, J. P., Park, J. Y., He, T. C. (2003). Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *Journal of Bone and Joint Surgery*, Vol. 85A, p. 1544-1552

Chien, H. H., Lin, W. L., Cho, M. I. (2000). Down-regulation of osteoblastic cell differentiation by epidermal growth factor receptor. *Calcified Tissue International*, Vol. 67, p. 141-150

Cho, T. J., Gerstenfeld, L. C., Einhorn, T. A. (2002). Differential temporal expression of members of the transforming growth factor β superfamily during murine fracture healing. *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol. 17, p. 513-520

Cho, Y. D., Kim, W. J., Yoon, W. J., Woo, K. M., Baek, J. H., Lee, G., Kim, G. S., Ryoo, H. M. (2012). Wnt3a stimulates MEPE, matrix extracellular phosphoglycoprotein, expression directly by the activation of the canonical Wnt signaling pathway and indirectly through the stimulation of autocrine Bmp-2 expression. *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 227, p. 2287-2296

Choong, C., Yuan, S., Thian, E. S., Oyane, A., Triffitt, J. (2012). Optimization of poly(ϵ -caprolactone) surface properties for apatite formation and improved osteogenic stimulation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 100A, p. 353-361

Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, Vol. 3, p. S131-S139

Clayden, J., Greenes, N., Warren, S., Wothers, P. (2001). *Organic Chemistry*. Oxford University Press, New York, NY, USA, 1512 p.

Collier, T. O., Jenney, C. R., Defife, K. M., Anderson, J. M. (1997). Protein adsorption on chemically modified surfaces. *Biomedical Sciences Instrumentation*, Vol. 33, p. 178-183

- Conway, J. D. (2010). Autograft and nonunions: morbidity with intramedullary bone graft versus iliac crest bone graft. *Orthopedic Clinics of North America*, Vol. 41, p. 75-84
- Critchley, D. R. (2009). Biochemical and Structural properties of the integrin-associated cytoskeletal protein talin. *Annual Review of Biophysics*, Vol. 38, p. 235-254
- Cui, H., Sinko, P. J. (2012). The role of cristallinity on differential attachment/proliferation of osteoblasts and fibroblasts on poly(caprolactone-co-glycolide) polymeric surfaces. *Frontiers of Materials Science*, Vol. 6, p. 47-59
- Danesin, R., Brun, P., Roso, M., Delaunay, F., Samouillan, V., Brunelli, K., Iucci, G., Ghezzi, F., Modesti, M., Castagliuolo, I., Dettin, M. (2012). Self-assembling peptide-enriched electrospun polycaprolactone scaffolds promote the h-osteoblast adhesion and modulate differentiation-associated gene expression. *Bone*, Vol. 51, p. 851-859
- David, L., Mallet, C., Mazerbourg, S., Feige, J. J., Bailly, S. (2007). Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood*, Vol. 109, p. 1953-19361
- David, L., Mallet, C., Keramidas, M., Lamandé, N., Gasc, J. M., Dupuis-Girod, S., Plauchu, H., Feige, J. J., Bailly, S. (2008). Bone Morphogenetic Protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circulation Research* , Vol. 102, p. 914-922
- Dong, Y. F., Soung, D. Y., Schwarz, E. M., O'Keefe, R. J., Drissi, H. (2006). Wnt induction of chondrocyte hypertrophy through the Runx2 transcription factor. *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 208, p. 77-86
- Drevelle, O., Bergeron, E., Senta, E., Lauzon, M. A., Roux, S., Grenier, G., Fauchoux, N. (2010). Effect of polycaprolactone on the behaviour of murine preosteoblasts. *Biomaterials*, Vol. 31, p. 6468-6476
- Drevelle, O., Daviau, A., Lauzon, M. A., Fauchoux, N. (2013). Effect of BMP-2 and/or BMP-9 on préostéoblastes attached to polycaprolactone functionalized by adhesive peptides derived from bone sialoprotein. *Biomaterials*, Vol. 34, p. 1051-1062

- Drevelle, O., Faucheux, N. (2013). Biomimetic materials for controlling bone cell responses. *Frontier in Bioscience (Scholar Edition)*, Vol. 5, p. 369-395
- Du, M., Yin, J., Zhu, M. J. (2010). Cellular signaling pathways regulating the initial stage of adipogenesis and marbling of skeletal muscle. *Meat Science*, Vol. 86, p. 103-109
- Dudley, A. T., Lyons, K. M., Robertson, E. J. (1995). A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes & Development*, Vol. 9, p.2795-2807
- Eriksen, E. F., Gundersen, H. J. G., Melsen, F., Mosekilde, L. (1984). Reconstruction of the formative site in Iliac trabecular bone in 20 normal individuals employing a kinetic model for matrix and mineral apposition. *Metabolic Bone Disease and Related Research*, Vol. 5, p. 243-252
- Eriksen, E. F. (2010). Cellular mechanisms of bone remodeling. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, Vol. 11, p. 219-227
- Faccio, R., Novack, D. V., Zallone, A., Ross, F. P., Teitelbaum, S. L. (2003a). Dynamic changes in the osteoclast cytoskeleton in response to growth factors and cell attachment are controlled by $\beta 3$ integrin. *Journal of Cell Biology*, Vol. 162, p. 499-509
- Faccio, R., Takeshita, S., Zallone, A., Ross, F. P., Teitelbaum, S. L. (2003b). c-Fms and the α v β 3 integrin collaborate during osteoclast differentiation. *Journal of Clinical Investigation*, Vol. 111, p. 749-758
- Faucheux, N., Schweiss, R., Lutzow, K., Werner, C., Groth, T. (2004). Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies. *Biomaterials*, Vol. 25, p. 2721-2730
- Faÿ, F., Linossier, I., Langlois, V., Renard, E., Vallée-Réhel, K. (2006). Degradation and controlled release behavior of ϵ -caprolactone copolymers in biodegradable antifouling coatings. *Biomacromolecules*, Vol. 7, p. 851-857
- FDA, Points to consider in the characterization of cell lines used to produce biologicals. 1993 Docket No. 84N-0154

- Fedi, P., Bafico, A., Nieto Soria, A., Burgess, W. H., Miki, T., Bottaro, D. P., Kraus, M. H., Aaronson, S. A. (1999). Isolation and biochemical characterization of the human Dkk-1 homologue, a novel inhibitor of mammalian Wnt signaling. *Journal of biological Chemistry*, Vol. 274, p. 19465-19472
- Fernandez-Tresguerres Hernandez-Gil, I., Alobera Gracia, M. A., del Canto Pingarron, M., Blanco Jerez, L. (2006). Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, Vol. 11, p. E47-E51
- Ferreira, A. M., Gentile, P., Chiono, V., Ciardelli, G. (2012). Collagen for bone tissue regeneration. *Acta Biomaterialia*, Vol. 8, p. 3191-3200
- Ferris, D. M., Moodie, G. D., Dimond, P. M., Giorani, C. W. D., Ehrlich, M. G., Valentini, R. F. (1999). RGD-coated titanium implants stimulate increased bone formation in vivo. *Biomaterials*, Vol. 20, p. 2323-2331
- Frisch, S. M., Vuori, K., Ruoslahti, E., Chan-Hui, P. Y. (1996). Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *Journal of Cell Biology*, Vol. 134, p. 793-799
- Fuentealba, L. C., Eivers, E., Ikeda, A., Hurtado, C., Kuroda, H., Pera, E. M., De Robertis, E. M. (2007). Integrating patterning signals: Wnt/GSK3 regulates the duration of the BMP/Smad1 signal. *Cell*, Vol. 131, p. 980-993
- Gabriel, M., van Nieuw Amerongen, G. P., van Hinsbergh, V. W. M., van Nieuw Amerongen, A. V., Zentner, A. (2006). Direct grafting of RGD-motif-containing peptide on the surface of polycaprolactone films. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, Vol. 17, p. 567-577
- Gabriel, M., Nazmi, K., Dahm, M., Zentner, A., Vahl, C. F., Strand, D. (2012). Covalent RGD modification of the inner pore surface of polycaprolactone scaffolds. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, Vol. 23, p. 941-953

- Gautieri, A., Vesentini, S., Redaelli, A., Buehler, M. J. (2011). Hierarchical structure and nanomechanics of collagen microfibrils from the atomistic scale up. *Nanoletters*, Vol. 11, p. 757-766
- Gazzerro, E., Canalis, E. (2006). Bone morphogenetic proteins and their antagonists. *Review in Endocrine and metabolic disorders*, Vol. 7, p. 51-65.
- Ge, C., Yang, Q., Zhao, G., Yu, H., Kirkwood, K. L., Franceschi, R. T. (2012). Interactions between extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 Map kinase pathways in the control of RUNX2 phosphorylation and transcriptional activity. *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol. 27, p. 538-551
- Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., Yamada, K. M. (2001). Transmembrane extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nature Reviews*, Vol. 2, p. 793-805
- Gelse, K., Pöschl, E., Aigner, T. (2003). Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 55, p. 1531-1546
- Giannoudis, P. V., Dinopoulos, H., Tsiridis, E. (2005). Bone substitutes : An update. *Injury*, Vol. 36S, p. S20-S27
- Gloria, A., Causa, F., Russo, T., Battista, E., Della Moglie, R., Zeppetelli, S., De Santis, R., Netti, P. A., Ambrosio, L. (2012). Three dimensional poly(ϵ -caprolactone) bioactive scaffolds with controlled structural and surface properties. *Biomacromolecules*, Vol. 13, p. 3510-3521
- Gong, Y., Slee, R. B., Fukai, N., Rawadi, G., Roman-Roman, S., Reginato, A. M., Wang, H., Cundy, T., Glorieux, F. H., Lev, D., Zacharin, M., Oexle, K., Marcelino, J., Suwairi, W., Heeger, S., Sabatakos, G., Apte, S., Adkins, W. N., Allgrove, J., Arslan-Kirchner, M., Batch, J. A., Beighton, P., Black, G. C. M., Boles, R. G., Boon, L. M., Borrone, C., Brunner, H. G., Carle, G. F., Dallapiccola, B., De Paepe, A., Floege, B., Lees Halphide, M., Hall, B., Hennekam, R. C., Hirose, T., Jans, A., Jüppner, H., Ae Kim, C., Keppler-Noreuil, K., Kohlschuetter, A., LaCombe, D., Lambert, M., Lemyre, E., Letteboer, T., Peltonen, L., Ramesar, R. S., Romanengo, M., Somer, H., Steichen-Gersdorf, E., Steinmann, B., Sullivan, B., Superti-Furga, A., Swoboda, W., van den Boogaard, M. J.,

- Van Hul, W., Vikkula, M., Votruba, M., Zabel, B., Garcia, T., Baron, R., Olsen, B. R., Warman, M. L. (2001). LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell*, Vol. 107, p. 513-523
- Grafenau, P., Carstanjen, B., Lepage, O. M. (2000). Osteocalcin: a biochemical marker of bone formation in equine medicine. *Veterinárni Medicína*, Vol. 45, p. 209-216
- Graham, S. M., Leonidou, A., Aslam-Pervez, N., Hamza, A., Panteliadis, P., Heliotis, M., Mantalaris, A., Tsiridis, E. (2010). Biological therapy of bone defects: the immunology of bone allo-transplantation. *Expert Opinion on Biological Therapy*, Vol. 10, p. 885-901
- Gramoun, A., Azizi, N., Sodek, J., Heersche, J. N. M., Nakchbandi, I., Manolson, M. F. (2010). Fibronectin inhibits osteoclastogenesis while enhancing osteoclast activity via nitric oxide and interleukin-1 β -mediated signaling pathways. *Journal of Cellular Biochemistry*, Vol. 111, p. 1020-1034
- Gugala, Z., Gogolewski, S. (2004). Differentiation, growth, and activity of rat bone marrow stromal cells on resorbable poly(L/DL-lactide) membranes. *Biomaterials*, Vol. 25, p. 2299-2307
- Guicheux, J., Lemonnier, J., Ghayor, C., Suzuki, A., Palmer, G., Caverzasio, J. (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. *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol. 18, p. 2060-2068
- Hakkarainen, M., Albertsson, A. C. (2002). Heterogeneous biodegradation of polycaprolactone – low molecular weight products and surface changes. *Macromolecular Chemistry and Physics*, Vol. 203, p. 1357-1363
- Harada, S. -i., Rodan, G. A. (2003). Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*, Vol. 423, p. 349-355
- Hayman, E. G., Pierschbacher, M. D., Suzuki, S., Ruoslahti, E. (1985). Vitronectin-a major cell attachment-promoting protein in fetal bovine serum. *Experimental Cell Research*, Vol. 160, p. 245-258

- He, X., Ma, J., Jabbari, E. (2008). Effect of grafting RGD and BMP-2 protein-derived peptides to a hydrogel substrate on osteogenic differentiation of marrow stromal cells. *Langmuir*, Vol. 24, p. 12508-12516
- He, X., Yang, X., Jabbari, E. (2012). Combined effect of osteopontin and BMP-2 derived peptides grafted to an adhesive hydrogel on osteogenic and vasculogenic differentiation of marrow stromal cells. *Langmuir*, Vol. 28, p. 5387-5397
- Heining, E., Bhushan, R., Paarmann, P., Henis, Y. I., Knaus, P. (2011). Spatial segregation of BMP/Smad signaling affects osteoblast differentiation in C2C12 cells. *PLoS ONE*, Vol. 6, p. e25163
- Heino, T. J., Kurata, K., Higaki, H., Väänänen, H. K. (2009). Evidence for the role of osteocytes in the initiation of targeted remodeling. *Technology and Health Care*, Vol. 17, p. 49-56
- Helfrich, M. H., Nesbitt, S. A., Lakkakorpi, P. T., Barnes, M. J., Bodary, S. C., Shankar, G., Mason, W. T., Mendrick, D. L., Väänänen, H. K., Horton, M. A. (1996). $\beta 1$ integrins and osteoclast function: Involvement in collagen recognition and bone resorption. *Bone*, Vol. 19, p. 317-328
- Hennessy, K. M., Clem, W. C., Phipps, M. C., Sawyer, A. A., Shaikh, F. M., Bellis, S. L. (2008). The effect of RGD peptides on osseointegration of hydroxyapatite biomaterials. *Biomaterials*, Vol. 29, p. 3075-3083
- Hersel, U., Dahmen, C., Kessler, H. (2003). RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*, Vol. 24, p. 4385-4415
- Hildebrand, J. D., Schaller, M. D., Parsons, J. T. (1995). Paxillin, a tyrosine phosphorylated focal adhesion-associated protein binds to the carboxyl terminal domain of focal adhesion kinase. *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 6, p. 637-647
- Hoang, Q. Q., Sicheri, F., Howard, A., Yang, D. S. C. (2003). Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure. *Nature*, Vol. 425, p. 977-980

- Hoffmann, A., Preobrazhenska, O., Wodarczyk, C., Medler, Y., Winkel, A., Shahab, S., Huylebroeck, D., Gross, G., Verschueren, K. (2005). Transforming growth factor- β -activated Kinase-1 (TAK1), a MAP3K, interacts with Smad proteins and interferes with osteogenesis in murine mesenchymal progenitors. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 280, p. 27271-27283
- Hoshi, K., Ozawa, H. (2000). Matrix vesicle calcification in bones of adult rats. *Calcified Tissue International*, Vol. 66, p. 430-434
- Houseman, B. T., Gawalt, E. S., Mrksich, M. (2003). Maleimide-functionalized self-assembled monolayers for the preparation of peptide and carbohydrate biochips. *Langmuir*, Vol. 19, p. 1522-1531
- Hsiong, S. X., Carampin, P., Kong, H. J., Lee, K. Y., Mooney, D. J. (2008). Differentiation stage alters matrix control of stem cells. *Journal of Biomedical Material Research Part A*, Vol. 85A, p. 145-156
- Hu, N., Jiang, D., Huang, E., Liu, X., Li, R., Liang, X., Kim, S. H., Chen, X., Gao, J. L., Zhang, H., Zhang, W., Kong, Y. H., Zhang, J., Wang, J., Shui, W., Luo, X., Liu, B., Cui, J., Rogers, M. R., Shen, J., Zhao, C., Wang, N., Wu, N., Luu, H. H., Haydon, R. C., He, T. C., Huang, W. (2012). BMP9-regulated angiogenic signaling plays an important role in the osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. *Journal of Cell Science*, Advance online article, doi: 10.1242/jcs.114231
- Huang, B., Sun, Y., Maciejewska, I., Qin, D., Peng, T., McIntyre, B., Wygant, J., Butler, W. T., C. Qin (2008). Distribution of SIBLING proteins in the organic and inorganic phases of rat dentin and bone. *European Journal of Oral Sciences*, Vol. 116, p. 104-112
- Hughes-Fulford, M., Li, C. F. (2011). The role of FGF-2 and BMP-2 in regulation of gene induction, cell proliferation and mineralization. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, Vol. 6, p. 1-8
- Huheey, J. E., Keiter, E. A., Keiter, R. L., (1996). *Chimie Inorganique*. De Boeck & Larcier s.a., Bruxelles, Belgique, 964 p.

- Hutmacher, D. W., Schantz, J. T., Lam, C. X. F., Tan, K. C., Lim, T. C. (2007). State of the art and future directions of scaffolds-based bone engineering from a biomaterials perspective. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Vol. 1, p. 245-260
- Hynes, R. O. (2002). Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, Vol. 110, p. 673-687
- Hyzy, S. L., Olivares-Navarrete, R., Schwartz, Z., Boyan, B. D. (2012). BMP2 induces osteoblast apoptosis in a maturation state and Noggin-dependent manner. *Journal of Cellular Biochemistry*, Vol. 113, p. 3236-3245
- Inada, M., Katagiri, T., Akiyama, S., Namiki, M., Komaki, M., Yamaguchi, A., Kamoi, K., Rosen, V., Suda, T. (1996). Bone morphogenetic protein-12 and -13 inhibit terminal differentiation of myoblasts, but do not induce their differentiation into osteoblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 222, p. 317-322
- Inoue, M., Ross, F. P., Erdmann, J. M., Abu-Amer, Y., Wei, S., Teitelbaum, S. L. (2000). Tumor necrosis factor alpha regulates alphavbeta5 integrin expression by osteoclast precursors in vitro and in vivo. *Endocrinology*, Vol. 141, p. 284-290
- Ishii, M., Egen, J. G., Klauschen, F., Meier-Schellersheim, M., Saeki, Y., Vacher, J., Proia, R. L., Germain, R. N. (2009). Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature*, Vol. 458, p. 524-528
- Ishii, M., Kikuta, J., Shimazu, Y., Meier-Schellersheim, M., Germain, R. N. (2010). Chemorepulsion by blood S1P regulates osteoclast precursor mobilization and bone remodeling in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, Vol. 207, p. 2793-2798
- Ishida, M., Amano, S. (2004). Osteocalcin fragment in bone matrix enhances osteoclast maturation at a late stage of osteoclast differentiation. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, Vol. 22, p. 415-429

- Janssen, M. E. W., Kim, E., Liu, H., Fujimoto, L. M., Bobkov, A., Volkmann, N., Hanein, D. (2006). Three-dimensional structure of vinculin bound to actin filaments. *Molecular Cell*, Vol. 21, p. 271-281
- Jikko, A., Harris, S. E., Chen, D., Mendrick, D. L., Damsky, C. H. (1999). Collagen integrin receptors regulate early osteoblast differentiation induced by BMP-2. *Journal of Bone Mineral Research*, Vol. 14, p. 1075-1083
- Joeng, K. S., Schumacher, C., Zylstra-Diegel, C. R., Long, F., Williams, B. O. (2011). Lrp5 and Lrp6 redundantly control skeletal development in the mouse embryo. *Developmental Biology*, Vol. 359, p. 222-229
- Jun, J. H., Yoon, W. J., Seo, S. B., Woo, K. M., Kim, G. S., Ryoo, H. M., Baek, J. H. (2010). BMP2-activated Erk/MAP Kinase stabilizes Runx2 by increasing p300 levels and histone acetyltransferase activity. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 285, p. 36410-36419
- Kamiya, Y., Miyazono, K., Miyazawa, K. (2010a). Smad7 inhibits transforming growth factor- β family type I receptors through two distinct modes of interaction. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 285, p. 30804-30813
- Kamiya, N., Kobayashi, T., Mochida, Y., Yu, P. B., Yamauchi, M., Kronenberg, H. M., Mishina, Y. (2010b). Wnt inhibitors Dkk1 and Sost are downstream targets of BMP signaling through the type IA receptor (BMPRIA) in osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol. 25, p. 200-210
- Kang, Q., Sun, M. H., Cheng, H., Peng, Y., Montag, A. G., Deyrup, A. T., Jiang, W., Luu, H. H., Luo, J., Szatkowski, J. P., Vanichakarn, P., Park, J. Y., Li, Y., Haydon, R. C., He, T. C. (2004). Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery. *Gene Therapy*, Vol. 11, p. 1312-1320
- Kang, Q., Song, W. X., Luo, Q., Tang, N., Luo, J., Luo, X., Chen, J., Bi, Y., He, B. C., Park, J. K., Jiang, W., Tang, Y., Huang, J., Su, Y., Zhu, G. H., He, Y., Yin, H., Hu, Z., Wang,

- Y., Chen, L., Zuo, G. W., Pan, X., Shen, J., Vokes, T., Reid, R. R., Haydon, R. C., Luu, H. H., He, T. C. (2009). A comprehensive analysis of the dual roles of BMPs in regulating adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. *Stem cells and Development*, Vol. 18, p. 545-559
- Karakecili, A., Satriano, C., Gumusderelioglu, M., Marletta, G. (2007). Relationship between the fibroblastic behaviour and surface properties of RGD-immobilized PCL membranes. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, Vol. 18, p. 317-319
- Kawabata, M., Imamura, T., Miyazono, K. (1998). Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, Vol. 9, p. 49-61
- Khor, H. L., Ng, K. W., Htay, A. S., Schantz, J. T., Teoh, S. H., Hutmacher, D. W. (2003). Preliminary study of a polycaprolactone membrane utilized as epidermal substrate. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, Vol. 14, p. 113-120
- Kim, H. K. W., Oxendine, I., Kamiya, N. (2013). High-concentration of BMP-2 reduces cell proliferation and increases apoptosis via DKK1 and SOST in human primary periosteal cells. *Bone*, Vol. 54, p. 141-150
- Kirsch, T., Sebald, W., Dreyer, M. K. (2000). Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex. *Nature Structural Biology*, Vol. 7, p. 492-496
- Klopp, L. S., Simon, B. J., Bush, J. M., Enns, R. M., Turner, A. S. (2008). Comparison of a caprolactone/lactide film (Mesofol) to two polylactide film products as a barrier to postoperative peridural adhesion in an ovine dorsal laminectomy model. *Spine*, Vol. 33, p. 1518-1526
- Knaus, P., Sebald, W. (2001). Cooperativity of binding epitopes and receptor chains in the BMP/TGF β superfamily. *Biological Chemistry*, Vol. 382, p. 1189-1195
- Knothe Tate, M. L., Adamson, J. R., Tami, A. E., Bauer, T. W. (2004). The osteocyte. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, Vol. 36, p. 1-8

- Kokabu, S., Gamer, L., Cox, K., Lowery, J., Tsuji, K., Raz, R., Economides, A., Katagiri, T., Rosen, V. (2012). BMP3 suppresses osteoblast differentiation of bone marrow stromal cells via interaction with Acvr2b. *Molecular Endocrinology*, Vol. 26, p. 87-94
- Kretschmar, M., Doody, J., Massagué, J. (1997). Opposing BMP and EGF signaling pathways converge on the TGF- β family mediator Smad1. *Nature*, Vol. 389, p. 618-622
- Kubota, T., Michigami, T., Ozono, K. (2009). Wnt signaling in bone metabolism. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, Vol. 27, p. 265-271
- Kugimiya, F., Kawaguchi, H., Kamekura, S., Chikuda, H., Ohba, S., Yano, F., Ogata, N., Katagiri, T., Harada, Y., Azuma, Y., Nakamura, K., Chung, U. (2005). Involvement of endogenous bone morphogenetic protein (BMP)2 and BMP6 in bone formation. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 280, p. 35704-35712
- Kumar, A., Gross, R.A. (2000). *Candida antartica* lipase B catalyzed polycaprolactone synthesis: effects of organic media and temperature. *Biomacromolecules*, Vol. 1, p.133-138
- Kusumi, A., Sakaki, H., Kusumi, T., Oda, M., Narita, K., Nakagawa, H., Kubota, K., Satoh, H., Kimura, H. (2005). Regulation of synthesis of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor- κ B ligand in normal human osteoblasts via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by the application of cyclic tensile strain. *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol. 23, p. 373-381
- Labet, M., Thielemans, W. (2009). Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chemical Society Reviews*, Vol. 38, p. 3484-3504
- Lai, C. F., Cheng, S. L. (2005). $\alpha_v\beta$ integrins play an essential role in BMP-2 induction of osteoblast differentiation. *Journal of Bone Mineral Research*, Vol. 20, p. 330-340
- Lam, C. X. F., Hutmacher, D. W., Schantz, J. T., Woodruff, M. A., Teoh, S. H. (2009). Evaluation of polycaprolactone scaffold degradation for 6 months in vitro and in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 90A, p. 906-919

- Lane, N. E., Yao, W., Nakamura, M. C., Humphrey, M. B., Kimmel, D., Huang, X., Sheppard, D., Ross, F. P., Teitelbaum, S. L. (2005). Mice lacking the integrin $\beta 5$ subunit have accelerated osteoclast maturation and increased activity in the estrogen-deficient state. *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol. 20, p. 58-66
- Lavery, K., Swain, P., Falb, D., Alaoui-Ismaili, M. H. (2008). BMP-2/4 and BMP-6/7 differentially utilize cell surface receptors to induce osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 283, p. 20948-20958
- Lecka-Czernik, B., Moerman, E. J., Grant, D. F., Lehmann, J. M., Manolagas, S. C., Jilka, R. L. (2002). Divergent effects of selective peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma 2$ ligands on adipocyte versus osteoblast differentiation. *Endocrinology*, Vol. 143, p. 2376-2384
- Lee, J. O., Bankston, L. A., Arnaout, M. A., Liddington, R. C. (1995). Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation? *Structure*, Vol. 3, p. 1333-1340
- Lee, A. J., Hodges, S., Eastell, R. (2000). Measurement of osteocalcin. *Annals of Clinical Biochemistry*, Vol. 37, p. 432-446
- Lee, S. Y., Voronov, S., Letinic, K., Nairn, A. C., Di Paolo, G., De Camilli, P. (2005). Regulation of the interaction between PIPKI γ and talin by proline-directed protein kinases. *Journal of Cell Biology*, Vol. 168, p. 789-799
- Lee, M. H., Ducheyne, P., Lynch, L., Boettiger, D., Composto, R. J. (2006). Effect of biomaterial surface properties on fibronectin- $\alpha 5\beta 1$ integrin interaction and cellular attachment. *Biomaterials*, Vol. 27, p. 1907-1916
- Lee, Y., Park, K. M., Bae, J. W., Park, K. D. (2013). Facile surface PEGylation via tyrosinase-catalyzed oxidative reaction for the preparation of non-fouling surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 102, p. 585-589

- LeGeros, R. Z., Kijkowska, R., Bautista, C., LeGeros, J. P. (1995). Synergistic effects of magnesium and carbonate on properties of biological and synthetic apatites. *Connective Tissue Research*, Vol. 33, p. 203-209
- Li, S., McCarthy, S. (1999). Influence of Crystallinity and Stereochemistry on the Enzymatic Degradation of Poly(lactide)s. *Macromolecules*, Vol. 32, p. 4454-4456
- Li, R. H., Wozney, J. M. (2001). Delivering on the promise of bone morphogenetic proteins. *Trends in Biotechnology*, Vol. 19, p. 255-265
- Li, C., Yang, X., He, Y., Ye, G., Li, X., Zhang, X., Zhou, L., Deng, F. (2012). Bone morphogenetic protein-9 induces osteogenic differentiation of rat dental follicle stem cells in p38 and ERK1/2 MAPK dependent manner. *International Journal of Medical Sciences*, Vol. 9, p. 862-871
- Liao, S., Chan, C. K., Ramakrishna, S. (2008). Stem cells and biomimetic materials strategies for tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*, Vol. 28, p. 1189-1202
- Lin, H. B., Zhao, Z. C., Garcia-Echeverria, C., Rich, D. H., Cooper, S. L. (1992). Synthesis of a novel polyurethane co-polymer containing covalently attached RGD peptide. *Journal of Biomaterial Science Polymer Edition*, Vol. 3, p. 217-227
- Lin, S. J., Lerch, T. F., Cook, R. W., Jaretzky, T. S., Woodruff, T. K. (2006). The structural basis of TGF- β , bone morphogenetic protein, and activin ligand binding. *Reproduction*, Vol. 132, p. 179-190
- Lin, C., Jiang, X., Dai, Z., Guo, X., Weng, T., Wang, J., Li, Y., Feng, G., Gao, X., He, L. (2009). Sclerostin mediates bone response to mechanical unloading through antagonizing Wnt/beta-catenin signaling. *Journal of Bone Mineral Research*, Vol. 10, p. 1651-1661
- Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G. H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X., He, X. (2007). Control of β -catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell*, Vol. 108, p. 837-847

- Liu, H., Liu, Y., Viggewarapu, M., Zheng, Z., Titus, L., Boden, S. C. (2011). Activation of c-Jun NH₂-terminal kinase 1 increases cellular responsiveness to BMP-2 and decreases bonding of inhibitory Smad6 to the type I BMP receptor. *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol. 26, p. 1122-1132
- Long, B., Dan, L., Jian, L., Yunyu, H., Shu, H., Zhi, Y. (2012). Evaluation of a novel reconstituted bone xenograft using processed bovine cancellous bone in combination with purified bovine bone morphogenetic protein. *Xenotransplantation*, Vol. 19, p. 122-132
- Ludwig, S. C., Kowalski, J. M., Boden, S. D. (2000). Osteoinductive bone graft substitutes. *European Spine Journal*, Vol. 9, p. S119–S125
- Lu, Z. F., Roohani-Esfahani, S. I., Kwok, P. C. L., Zreiqat, H. (2013). Osteoblasts on rod shaped hydroxyapatite nanoparticles incorporated PCL film provide an optimal osteogenic niche for stem cell differentiation. *Tissue Engineering Part A*, Vol. 17, p. 1651-1661
- Luo, J., Tang, M., Huang, J., He, B. C., Gao, J. L., Chen, L., Zuo, G. W., Zhang, W., Luo, Q., Shi, Q., Zhang, B. Q., Bi, Y., Luo, X., Jiang, W., Su, Y., Shen, J., Kim, S. H., Huang, E., Gao, Y., Zhou, J. Z., Yang, K., Luu, H. H., Pan, X., Haydon, R. C., Deng, Z. L., He, T. C. (2010). TGF β /BMP Type I receptors ALK1 and ALK2 are essential for BMP9-induced osteogenic signaling in mesenchymal stem cells. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 285, p. 29588-29598
- Luther, G., Wagner, E. R., Zhu, G., Kang, Q., Luo, Q., Lamplot, J., Bi, Y., Luo, X., Luo, J., Teven, C., Shi, Q., Kim, S. H., Gao, J. L., Huang, E., Yang, K., Rames, R., Liu, X., Li, M., Hu, N., Liu, H., Su, Y., Chen, L., He, B. C., Zuo, G. W., Deng, Z. L., Reid, R. R., Luu, H. H., Haydon, R. C., He, T. C. (2011). BMP-9 induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: Molecular mechanism and therapeutic potential. *Current Gene Therapy*, Vol. 11, p. 229-240
- Luxenburg, C., Addadi, L., Geiger, B. (2006). The molecular dynamics of osteoclast adhesions. *European Journal of Cell Biology*, Vol. 85, p. 203-211

- MacDonald, B. T., Semenov, M. V., He, X. (2007). Snapshot: Wnt/ β -catenin signaling. *Cell*, Vol. 131, p. 1204e1-1204e2
- Mann, B., Gelos, M., Siedow, A., Hanski, M. L., Gratchev, A., Ilyas, M., Bodmer, W. F., Moyer, M. P., Riecken, E. O., Buhr, H. J., Hanski, C. (1999). Target genes of β -catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, Vol. 96, p. 1603-1608
- Manolagas, S. C. (2000). Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Reviews*, Vol. 21, p. 115-137
- Marcellini, S., Henriquez, J. P., Bertin, A. (2012). Control of osteogenesis by the canonical Wnt and BMP pathways in vivo. *Bioessays*, Vol. 34, p. 953-962
- Marie, P. (2001). Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste. *Médecine Sciences*, Vol. 17, p.1252-1259
- Marletta, G., Ciapetti, G., Satriano, C., Pagani, S., Baldini, N. (2005). The effect of irradiation modification and RGD sequence adsorption on the response of human osteoblasts to polycaprolactone. *Biomaterials*, Vol. 26, p. 4793-4804
- Martin, R. B. (2007). Targeted bone remodeling involves BMU steering as well as activation. *Bone*, Vol. 40, p. 1574-1580
- Martinovic, S., Borovecki, F., Miljavac, V., Kistic, V., Maticic, D., Francetic, I., Vukicevic, S. (2006). Requirement of a bone morphogenetic protein for the maintenance and stimulation of osteoblast differentiation. *Archives of Histology and Cytology*, Vol. 69, p. 23-36
- Marquis, M. E., Lord, E., Bergeron, E., Bourgoin, L., Faucheux, N. (2008). Short-term effects of adhesion peptides on the responses of preosteoblasts to pBMP-9. *Biomaterials*, Vol. 29, p. 1005-1016

- Marquis, M. E., Lord, E., Bergeron, E., Drevelle, O., Park, H., Cabana, F., Senta, H., Fauchoux, N. (2009). Bone cells-biomaterials interactions. *Frontiers in Bioscience*, Vol. 14, p. 1023-1067
- Massagué, J. (2003). Integration of Smad and MAPK pathways: a link and linker revisited. *Genes & Development*, Vol. 17, p. 2993-2997
- Massagué, J., Seoane, J., Wotton, D. (2005). Smad transcription factors. *Genes & Development*, Vol. 19, p. 2783-2810
- Matsubara, T., Kida, K., Yamaguchi, A., Hata, K., Ichida, F., Meguro, H., Aburatani, H., Nishimura, R., Yoneda, T. (2008). BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 283, p. 29119-29125
- Matsumoto, Y., Otsuka, F., Hino, J., Miyoshi, T., Takano, M., Miyazato, M., Makino, H. and Kangawa, K. (2012). Bone morphogenetic protein-3b (BMP-3b) inhibits osteoblast differentiation via Smad2/3 pathway by counteracting Smad1/5/8 signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Vol. 350, p. 78-86
- Mazerbourg, S., Hsueh, A. J. W. (2006). Genomic analyses facilitate identification of receptors and signalling pathways for growth differentiation factor 9 and related orphan bone morphogenetic protein/growth differentiation factor ligands. *Human Reproduction Update*, Vol. 12, p. 373-383
- Medtronic : <http://www.medtronic.com> (Consulté décembre 2012)
- Mendenhall Associates (2008). Bone Graft and bone substitutes. *Orthopedic Network News*, Vol. 19, No. 4
- Michael, K. E., Vernekar, V. N., Keselowsky, B. G., Meredith, J. C., Latour, R. A., Garcia, A. J. (2003). Adsorption-induced conformational changes in fibronectin due to interactions with well-defined surface chemistries. *Langmuir*, Vol. 19, p. 8033-8040

- Michel, R., Pasche, S., Textor, M., Castner, D. G. (2005). Influence of PEG architecture on protein adsorption and conformation. *Langmuir*, Vol. 21, p. 12327-12332
- Middleton, J. C., Tipton, A. J. (2000). Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*, Vol. 21, p. 2335-2346
- Mikami, Y., Asano, M., Honda, M. J., Takagi, M. (2010). Bone morphogenetic protein 2 and dexamethasone synergistically increase alkaline phosphatase levels through JAK/STAT signaling in C3H10T1/2 cells. *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 223, p. 123-133
- Minear, S., Leucht, P., Jiang, J., Liu, B., Zeng, A., Fuerer, C., Nusse, R., Helms, J. A. (2010). Wnt proteins promote bone regeneration. *Science Translational Medicine*, Vol. 2, p. 29ra30
- Miyazono, K. (1999). Signal transduction by bone morphogenetic protein receptors: functional roles of Smad proteins. *Bone*, Vol. 25, p. 91-93
- Mochida, Y., Parisuthiman, D., Pornprasertsuk-Damrongsri, S., Atsawasuwana, P., Sricholpech, M., Boskey, A. L., Yamauchi, M. (2009). Decorin modulates collagen matrix assembly and mineralization. *Matrix Biology*, Vol. 28, p. 44-52
- Morawska-Chochol, A., Jaworska, J., Chlopek, J., Kasperczyk, J., Dobrzyński, P., Paluszkiwicz, C., Bajor, G. (2011). Degradation of poly(lactide-co-glycolide) and its composites with carbon fibres and hydroxyapatite in rabbit femoral bone. *Polymer Degradation and Stability*, Vol. 96, p. 719-726
- Muguruma, M., Matsumura, S., Fukazawa, T. (1990). Direct interactions between talin and actin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 171, p. 1217-23
- Mukai, T., Otsuka, F., Otani, H., Yamashita, M., Takasugi, K., Inagaki, K., Yamamura, M., Makino, H. (2007). TNF- α inhibits BMP-induced osteoblast differentiation through activating SAPK/JNK signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 356, p. 1004-1010

- Murakami, G., Watabe, T., Takaoka, K., Miyazono, K., Imamura, T. (2003). Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 14, p. 2809-2817
- Nakagawa, N., Kinoshita, M., Yamaguchi, K., Shima, N., Yasuda, H., Yano, K., Morinaga, T., Higashio, K. (1998). RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*, Vol. 253, p. 395-400
- Nakamura, I., Pilkington, M. F., Lakkakorpi, P. T., Lipfert, L., Sims, S. M., Dixon, S. J., Rodan, G. A., Duong, L. T. (1999). Role of $\alpha_v\beta_3$ integrin in osteoclast migration and formation of the sealing zone. *Journal of Cell Science*, Vol. 112, p. 3985-3993
- Nakashima, A., Katagiri, T., Tamura, M. (2005). Cross-talk between Wnt and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) signaling in differentiation pathway of C2C12 myoblasts. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 280, p. 37660-37668
- Ng, K. W., Huttmacher, D. W., Schantz, J. T., Seng, C., Too, H. P., Lim, T. C., Phan, T. T., Teoh, S. H. (2001). Evaluation of Ultra-Thin Poly(ϵ -Caprolactone) Films for Tissue-Engineered Skin. *Tissue Engineering*, Vol. 7, p. 441-455
- Nickel, J., Dreyer, M. K., Kirsch, T., Sebald, W. (2001). The crystal structure of the BMP-2:BMPIA complex and the generation of BMP-2 antagonists. *Journal of Bone & Joint Surgery*, Vol. 83A, p. S1-7 S1-14
- Novack, D. V. and Faccio, R. (2011). Osteoclast motility: Putting the brakes on bone resorption. *Ageing Research Reviews*, Vol. 10, p. 54-61
- Nudelman, F., Pieterse, K., George, A., Bomans, P. H. H., Friedrich, H., Brylka, L. J., Hilbers, P. A. J., de With, G., Sommerdijk, N. A. J. M. (2010). The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors. *Nature Materials*, Vol. 9, p. 1004-1009
- Ode, A., Duda, G. N., Glaeser, J. D., Matziolis, G., Frauenschuh, S., Perka, C., Wilson, C. J., Kasper, G. (2010). Toward biomimetic materials in bone regeneration: Functional

behavior of mesenchymal stem cells on a broad spectrum of extracellular matrix components. *Journal of Biomedical Material Research Part A*, Vol. 95A, p. 1114-1124

Okada, Y., Morimoto, I., Ura, K., Watanabe, K., Eto, S., Kumegawa, M., Raisz, L., Pilbeam C., Tanaka, Y. (2002). Cell-to-cell adhesion via intercellular adhesion molecule-1 and leukocyte function-associated antigen-1 pathway is involved in $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, PTH and IL-1 α -induced osteoclast differentiation and bone resorption. *Endocrine Journal*, Vol. 49, p. 483-495

Organisation Mondiale de la Santé, Statistique sanitaire mondiale 2012 (2012)
http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/FR_WHS2012_Full.pdf

Osada, M., Inoue, O., Ding, G., Shirai, T., Ichise, H., Hirayama, K., Takano, K., Yatomi, Y., Hirashima, M., Fujii, H., Suzuki-Inoue, K., Ozaki, Y. (2012). Platelet activation receptor CLEC-2 regulates blood/lymphatic vessel separation by inhibiting proliferation, migration, and tube formation of lymphatic endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 287, p. 22241-22252

Osyczka, A. M., Leboy, P. S. (2005). Bone morphogenetic protein regulation of early osteoblast genes in human marrow stromal cells is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-Kinase signaling. *Endocrinology*, Vol. 146, p. 3428-3437

Oursler, M. J. (2010). Recent advances in understanding the mechanisms of osteoclast precursor fusion. *Journal of Cellular Biochemistry*, Vol. 110, p. 1058-1062

Pankov, R., Yamada, K. M. (2002). Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science*, Vol. 115, p. 3861-3863

Park, S. H., Park, D. S., Shin, J. W., Kang, Y. G., Kim, H. K., Yoon, T. R., Shin, J. W. (2012a). Scaffolds for bone tissue engineering fabricated from two different materials by the rapid prototyping technique: PCL versus PLGA. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 23, p. 2671-2678

- Park, J. E. S., Shao, D., Upton, P. D., deSouza, P., Adcock, I. M., Davies, R. J., Morrell, N. W., Griffiths, M. J. D., Wort, S. J. (2012b). BMP-9 induced endothelial cell tubule formation and inhibition of migration involves Smad1 driven endothelin-1 production. *PLoS ONE*, Vol. 7, p. e3007
- Parfitt, A. M. (1994). Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *Journal of Cellular Biochemistry*, Vol. 55, p. 273-286
- Pfaff, M., Jurdic, P. (2001). Podosomes in osteoclast-like cells: structural analysis and cooperative roles of paxillin, proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) and integrin α V β 3. *Journal Cell Science*, Vol. 114, p. 2775-2786
- Pierschbacher, M. D., Ruoslahti, E. (1984a). Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*, Vol. 309, p. 30-33
- Pierschbacher, M. D., Ruoslahti, E. (1984b). Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, Vol. 81, p. 5985-5988
- Pollock, R., Alcelik, I., Bhatia, C., Chuter, G., Lingutla, K., Budithi, C., Krishna, M. (2008). Donor site morbidity following iliac crest bone harvesting for cervical fusion: a comparison between minimally invasive and open techniques. *European Spine Journal*, Vol. 17, p. 845-852
- Pourcelle, V., Devouge, S., Garinot, M., Pr at, V., Marchand-Brynaert, J. (2007). PCL-PEG-based nanoparticles grafted with GRGDS peptide: preparation and surface analysis by XPS. *Biomacromolecules*, Vol. 8, p. 3977-3983
- Puleo, D. A., Nancy, A. (1999). Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials*, Vol. 20, p. 2311-2321
- Qin, C., Baba, O., Butler, W. T. (2004). Post-translational modifications of SIBLING proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, Vol. 15, p. 126-136

- Qu, F., Wang, J., Xu, N., Liu, C., Li, S., Wang, N., Qi, W., Li, H., Li, C., Geng, Z., Liu, Y. (2013). WNT3A modulates chondrogenesis via canonical and non-canonical Wnt pathways in MSCs. *Frontier in Bioscience*, Vol. 18, p.493-503
- Radi, Z. A., Khan, N. K., (2005). Effects of cyclooxygenase inhibition on bone, tendon, and ligament healing. *Inflammation Research*, Vol. 54, p. 358-366
- Raggat, L. J., Partridge, N. C. (2010). Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 285, p. 25013-25108
- Rapuano, B. E., Wu, C., MacDonald, D. E. (2004). Osteoblast-like cell adhesion to bone sialoprotein peptides. *Journal of Orthopaedic Research*, Vol. 22 p. 353-361
- Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., Lemons, J. E. (2004). *Biomaterials Science. An introduction to materials in medicine*, 2ème Edition. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, USA, 851 p.
- Redick, S. D., Settles, D. L., Briscoe, G., Erickson, P. (2000). Defining fibronectin's cell adhesion synergy site by site-directed mutagenesis. *Journal of Cell Biology*, Vol. 149, p. 521-527
- Reichert, J. C., Wullschlegert, M. E., Cipitria, A., Lienau, J., Cheng, T. K., Schütz, M. A., Duda, G. N., Nöth, U., Eulert, J., Hutmacher, D. W. (2011). Custom-made composite scaffolds for segmental defect repair in long bones. *International Orthopaedics*, Vol. 35, p. 1229-1236
- Reyes, C. D., Petrie, T. A., Burns, K. L., Schwartz, Z., Garcia, A. J. (2007). Biomolecular surface coating to enhance orthopaedic tissue healing and integration. *Biomaterials*, Vol. 28, p. 3228-3235
- Rezania, A., Thomas, C. H., Branger, A. B., Waters, C. M., Healy, K. E. (1997). The detachment strength and morphology of bone cells contacting materials modified with a peptide sequence found within bone sialoprotein. *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 37, p. 9-19

- Rezania, A., Healy, K. E. (1999a). Biomimetic peptide surfaces that regulates adhesion, spreading, cytoskeletal organization, and mineralization of the matrix deposited by osteoblast-like cells. *Biotechnology progress*, Vol. 15, p. 19-32
- Rezania, A., Healy, K. E. (1999b). Integrin subunits responsible for adhesion of human osteoblast-like cells to biomimetic peptide surfaces. *Journal of Orthopaedic Research*, Vol. 17, p. 615-623
- Rezania, A., Healy, K. E. (2000). The effect of peptide surface density on mineralization of a matrix deposited by osteogenic cells. *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 52, p. 595-600
- Rho, J. Y., Ashman, R. B., Turner, C. H. (1993). Young's modulus of trabecular and cortical bone material: ultrasonic and microtensile measurements. *Journal of Biomechanics*, Vol. 26, p. 111-119
- Ro, T. B., Holt, R. U., Brenne, A. T., Hjorth-Hansen, H., Waage, A., Hjertner, O., Sundan, A., Borset, M. (2004). Bone morphogenetic protein-5,-6 and-7 inhibit growth and induce apoptosis in human myeloma cells. *Oncogene*, Vol. 23, p. 3024-3032
- Roach, H. I. (1994). Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption. *Cell Biology International*, Vol. 18, p. 617-628
- Rodan, S. B., Rodan, G. A. (1997). Integrin function in osteoclasts. *Journal of Endocrinology*, Vol. 154, p. S47-S56
- Rohner, D., Huttmacher, D. W., Cheng, T. K., Oberholzer, M., Hammer, B. (2003). In vivo efficacy of bone-marrow-coated polycaprolactone scaffolds for the reconstruction of orbital defects in the pig. *Journal of Biomedical Materials Research PartB: Applied Biomaterials*, Vol. 66B, p. 574-580
- Rosen, V. (2006). BMP and BMP inhibitors in bone. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 1068, p. 19-25

- Ross, S. E., Hemati, N., Longo, K. A., Bennett, C. N., Lucas, P. C., Erickson, R. L., MacDougald, O. A. (2000). Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science*, Vol. 289, p. 950–953
- Rouxhet, L., Duhoux, F., Borecky, O., Legras, R., Schneider, Y. J. (1998). Adsorption of albumin, collagen, and fibronectin on the surface of poly(hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) (PHB/HV) and of poly(ϵ -caprolactone) (PCL) films modified by alkaline hydrolysis and of poly(ethylene terephthalate) (PET) track-etched membranes. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, Vol. 9, p. 1279-1304
- Rubinfeld, B., Albert, I., Porfiri, E., Fiol, C., Munemitsu, S., Polakis, P. (1996). Binding of GSK3 β to the APC- β -catenin complex and regulation of complex assembly. *Science*, Vol. 272, p. 1023-1026
- Ruoslahti, E., Pierschbacher, M. D. (1987). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*, Vol. 38, p. 491-497
- Ruppert, R., Hoffmann, E., Sebald, W. (1996). Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity. *European Journal of Biochemistry*, Vol. 237, p. 295-302
- Sato, M. M., Nakashima, A., Nashimoto, M., Yawaka, Y., Tamura, M. (2009). Bone morphogenetic protein-2 enhances Wnt/ β -catenin signaling-induced osteoprotegerin expression. *Genes to Cells*, Vol. 14, p. 141-153
- Savarino, L., Baldini, N., Greco, M., Capitani, O., Pinna, S., Valentini, S., Lombardo, B., Esposito, M. T., Pastore, L., Ambrosio, L., Battista, S., Causa, F., Zeppetelli, S., Guarino, V., Netti, P. A. (2007). The performance of poly- ϵ -caprolactone scaffolds in a rabbit femur model with and without autologous stromal cells and BMP-4. *Biomaterials*, Vol. 28, p. 3101-3109
- Schaller, M. D., Hildebrand, J. D., Shannon, J. D., Fox, J. W., Vines, R. R., Parsons, J. T. (1994). Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125^{FAK}, directs SH2-dependent binding of pp60^{src}. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 14, p. 1680-1688

- Schantz, J. T., Lim, T. C., Ning, C., Teoh, S. H., Tan, K. C., Wang, S. C., Hutmacher, D. W. (2006). Cranioplasty after trephination using a novel biodegradable burr hole cover: technical case report. *Neurosurgery*, Vol. 58 (suppl. 1), p. ONS-176
- Scharpfenecker, M., van Dinther, M., Liu, Z., van Bezooijen, R. L., Zhao, Q. H., Pukac, L., Löwik, C. W. G. M., ten Dijke, P. (2007). BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *Journal of Cell Science*, Vol. 120, p. 964-972
- Schlaepfer, D. D., Hunter, T. (1996). Evidence for in vivo phosphorylation of the Grb2 SH2-domain binding site on focal adhesion kinase by Src-family protein-tyrosine kinases. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 16, p. 5623-5633
- Schlaepfer, D. D., Mitra, S. K. (2004). Multiple connections link FAK to cell motility and invasion. *Current Opinion in Genetics & Development*, Vol. 14, p. 92-101
- Schneider, G., Burridge, K. (1994). Formation of focal adhesions by osteoblasts adhering to different substrata. *Experimental Cell Research*, Vol. 214, p. 264-269
- Senta, H., Park, H., Bergeron, E., Drevelle, O., Fong, D., Leblanc, E., Cabana, F., Roux, S., Grenier, G., Fauchoux, N. (2009). Cell responses to bone morphogenetic proteins and peptides derived from them: Biomedical applications and limitations. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, Vol. 20, p. 213-222
- Servier Medical Art. <http://www.servier.fr/servier-medical-art>
- Shapiro, F. (1988). Cortical bone repair. The relationship of the lacunar-canalicular system and intercellular gap junctions to the repair process. *Journal of Bone and Joint Surgery American Volume*, Vol. 70, p. 1067-1081
- Sharff, K. A., Song, W. X., Luo, X., Tang, N., Luo, J., Chen, J., Bi, Y., He, B. C., Huang, J., Li, X., Jiang, W., Zhu, G. H., Su, Y., He, Y., Shen, J., Wang, Y., Chen, L., Zuo, G. W., Liu, B., Pan, X., Reid, R. R., Luu, H. H., Haydon, R. C., He, T. C. (2009). Hey1 basic helix-loop-helix protein plays an important role in mediating BMP9-induced osteogenic

- differentiation of mesenchymal progenitor cells. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 284, p. 649-659
- Shen, B., Bhargav, D., Wei, A., Williams, L. A., Tao, H., Ma, D. D. F., Diwan, A. D. (2009). BMP-13 emerges as a potential inhibitor of bone formation. *International Journal of Biological Sciences*, Vol. 5, p. 192-200
- Shen, B., Wei, A., Whittaker, S., Williams, L. A., Tao, H., Ma, D. D. F., Diwan, A. D. (2010). The role of BMP-7 in chondrogenic and osteogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry*, Vol. 109, p. 406-416
- Shim, J. H., Greenblatt, M. B., Xie, M., Schneider, M. D., Zou, W., Zhai, B., Gygi, S., Glimcher, L. H. (2009). TAK1 is an essential regulator of BMP signalling in cartilage. *European Molecular Biology Organization Journal*, Vol. 28, p. 2028-2041
- Shin, H., Zygouraskis, K., Farach-Carson, M. C., Yaszemski, M. J., Mikos, A. G. (2004). Attachment, proliferation and migration of marrow stromal osteoblasts cultured on biomimetic hydrogels modified with an osteopontin-derived peptide. *Biomaterials*, Vol. 25, p. 895-906
- Sieber, C., Kopf, J., Hiepen, C., Knaus, P. (2009). Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, Vol. 20, p. 343-355
- Smith, E., Yang, J., McGann, L., Sebald, W., Uludaq, H. (2005). RGD-grafted thermoreversible polymers to facilitate attachment of BMP-2 responsive C2C12 cells. *Biomaterials*, Vol. 26, p. 7329-7338
- Sodek, J., Zhu, B., Huynh, M. H., Brown, T. J., Ringuette, M. (2002). Novel functions of the matricellular proteins osteopontin and osteonectin/SPARC. *Connective Tissue Research*, Vol. 43, p.308-319
- Spencer, G. J., Utting, J. C., Etheridge, S. L., Arnett, T. R., Genever, P. G. (2006). Wnt signalling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of NFκB ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Journal of Cell Science*, Vol. 119, p. 1283-1296

- Staatz, W. D., Fok, K. F., Zutter, M. M., Adams, S. P., Rodriguez, B. A., Santoro, S. A. (1991). Identification of a tetrapeptide recognition sequence for the $\alpha_2\beta_1$ integrin in collagen. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 266, p. 7363-7367
- Steele, J. G., Dalton, B. A., Johnson, G., Underwood, P. A. (1995). Adsorption of fibronectin and vitronectin onto PrimariaTM and tissue culture polystyrene and relationship to the mechanism of initial attachment of human vein endothelial cells and BHK-21 fibroblasts. *Biomaterials*, Vol. 16, p. 1057-1067
- Stolina, M., Schett, G., Dwyer, D., Vonderfecht, S., Middleton, S., Duryea, D., Pacheco, E., Van, G., Bolon, B., Feige, U., Zack, D., Kostenuik, P. (2009). RANKL inhibition by osteoprotegerin prevents bone loss without affecting local or systemic inflammation parameters in two rat arthritis models: comparison with anti-TNFalpha or anti-IL-1 therapies. *Arthritis Research and Therapy*, Vol. 11, R187
- Su, J.L., Chiou, J., Tang, C. H., Zhao, M., Tsai, C. H., Chen, P. S., Chang, Y. W., Chien, M. H., Peng, C. Y., Hsiao, M., Kuo, M. L., Yen, M. L. (2010). CYR61 regulates BMP-2-dependent osteoblast differentiation through the $\alpha_v\beta_3$ integrin/integrin-linked kinase/ERK pathway. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 285, p. 31325-31336
- Sun, H., Önnby, S. (2006). Facile polyester surface functionalization via hydrolysis and cell-recognizing peptide attachment. *Polymer International*, Vol. 55, p. 1336-1340
- Suttapreyasri, S., Koontongkaew, S., Phongdara, A., Leggat, U. (2006). Expression of bone morphogenetic proteins in normal human intramembranous and endochondral bones. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, Vol. 35, p. 444-452
- Suzuki, A., Guicheux, J., Palmer, G., Miura, Y., Oiso, Y., Bonjour, J. -P., Caverzasio, J. (2002). Evidence for a role of p38 MAP Kinase in expression of alkaline phosphatase during osteoblastic cell differentiation. *Bone*, Vol. 30, p. 91-98
- Takeuchi, Y., Suzawa, M., Kikuchi, T., Nishida, E., Fujita, T., Matsumoto, T. (1997). Differentiation and transforming growth factor-beta receptor down-regulation by collagen-alpha2 beta1 integrin interaction is mediated by focal adhesion kinase and its

- downstream signals in murine osteoblastic cells. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 272, p. 29309-29316
- Tamura, Y., Takeuchi, Y., Suzawa, M., Fukumoto, S., Kato, M., Miyazono, K., Fujita, T. (2001). Focal adhesion kinase activity is required for bone morphogenetic protein-Smad1 signaling and osteoblastic differentiation in murine MC3T3-E1 cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol. 16, p. 1772-1779
- Tan, P. S., Teoh, S. H. (2007). Effect of stiffness of polycaprolactone (PCL) membrane on cell proliferation. *Material Science and Engineering C*, Vol. 27, p. 304-308
- Tang, N., Song, W. X., Luo, J., Luo, X., Chen, J., Sharff, K. A., Bi, Y., He, B. C., Huang, J. Y., Zhu, G. H., Su, Y. X., Jiang, W., Tang, M., He, Y., Wang, Y., Chen, L., Zuo, G. W., Shen, J., Pan, X., Reid, R. R., Luu, H. H., Haydon, R. C., He, T. C. (2009). BMP-9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitors requires functional canonical Wnt/ β -catenin signalling. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, Vol.13, p.2448-2464
- Thakurta, S. G., Subramanian, A. (2011). Evaluation of in situ albumin binding surfaces: a study of protein adsorption and platelet adhesion. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, Vol. 22, p. 137-149
- Tian, H., Myhre, K., Golzio, C., Katsanis, N., Blobel, G. C. (2012). Endoglin mediates fibronectin/ α 5 β 1 integrin and TGF- β pathway crosstalk in endothelial cells. *EMBO Journal*, Vol. 31, p. 3885-3900
- Toppets, V., Pastoret, V., De Behr, V., Antoine, N., Dessy, C., Gabriel, A. (2004). Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux. *Annales de Médecine Vétérinaire*, Vol. 148, p. 1-13
- Troen, B. R. (2006). The regulation of cathepsin K gene expression. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol. 1068, p. 165-172

- Tye, C. E., Rattray, K. R., Warner, K. J., Gordon, J. A. R., Sodek, J., Hunter, G. K., Goldberg, H. A. (2003). Delineation of the hydroxyapatite-nucleating domains of bone sialoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 278, p. 7949-7955
- Urabe, K., Itoman, M., Toyama, Y., Yanase, Y., Iwamoto, Y., Ohgushi, H., Ochi, M., Takakura, Y., Hachiya, Y., Matsuzaki, H., Matsusue, Y., Mori, S. (2007). Current trends in bone grafting and the tissue of banked bone allografts based on the fourth nationwide survey of bone grafting status from 2000 to 2004. *Journal of Orthopaedic Science*, Vol. 12, p. 520-525
- Urist, M. R. (1965). Bone formation by autoinduction. *Science*, Vol. 150, p. 893-899
- Urist, M. R., Strates, B. S. (1971). Bone morphogenetic protein. *Journal of Dental Research*, Vol. 50, p. 1392-1406
- Valverde, P., Tu, Q., Chen, J. (2005). BSP and RANKL induce osteoclastogenesis and bone resorption synergistically. *Journal of Bone Mineral Research*, Vol. 20, p. 1669-1679
- van Amerongen, R., Nusse, R. (2009). Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development*, Vol. 136, p. 3205-3214
- Väänänen, H. K., Laitala-Leinone, T. (2008). Osteoclast lineage and function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 473, p. 132-138
- Vance, R. J., Miller, D. C., Thapa, A., Haberstroh, K. M., Webster, T. J. (2004). Decreased fibroblast cell density on chemically degraded poly-lactic-co-glycolic acid, polyurethane, and polycaprolactone. *Biomaterials*, Vol. 25, p. 2095-2103
- Varga, A. C., Wrana, J. L. (2005). The disparate role of BMP in stem cell biology. *Oncogene*, Vol. 24, p. 5713-5721
- Villarreal, X. C., Mann, K. G., Long, G. L. (1989). Structure of human osteonectin based upon analysis of cDNA and genomic sequences. *Biochemistry*, Vol. 28, p. 6483-6491

- Visser, R., Arrabal, P. M., Santos-Ruiz, L., Becerra, J., Cifuentes, M. (2012). Basic fibroblast growth factor enhances the osteogenic differentiation induced by bone morphogenetic protein-6 in vitro and in vivo. *Cytokine*, Vol. 58, p. 27-33
- Wang, X., Goh, C. H., Li, B. (2007). p38 mitogen-activated protein kinase regulates osteoblast differentiation through osterix. *Endocrinology*, Vol. 148, p. 1629-1637
- Watanabe-Takano, H., Takano, K., Keduka, E., Endo, T. (2010). M-Ras is activated by bone morphogenetic protein-2 and participates in osteoblastic determination, differentiation, and transdifferentiation. *Experimental Cell Research*, Vol. 316, p. 477-490
- Wei, A. Q., Brisby, H., Chung, S. A., Diwan, A. D. (2008). Bone morphogenetic protein-7 protects human intervertebral disc cells in vitro from apoptosis. *The Spine Journal*, Vol. 8, p. 466-474
- Wen, K. K., Rubenstein, A., DeMali, K. A. (2009). Vinculin nucleates actin polymerization and modifies actin filament structure. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 284, p. 30463-30473
- Wojtowicz, A. M., Shekaran, A., Oest, M. E., Dupont, K. M., Templeman, K. L., Huttmacher, D. W., Guldberg, R. E., Garcia, A. J. (2010). Coating of biomaterials scaffolds with the collagen-mimetic peptide GFOGER for bone defect repair. *Biomaterials*, Vol. 31, p. 2574-2582
- Wozniak, M. A., Modzelewska, K., Kwong, L., Keely, P. J. (2004). Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1692, p. 103-119
- Wu, J. W., Fairman, R., Penry, J., Shi, Y. (2001). Formation of a stable heterodimer between Smad2 and Smad4. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 276, p. 20688-20694
- Wu, H. D., Yang, J. C., Tsai, T., Ji, D. Y., Chang, W. J., Chen, C. C., Lee, S. Y. (2011). Development of a chitosan-polyglutamate based injectable polyelectrolyte complex scaffold. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 85, p.318-324

- Wutticharoenmongkol, P., Pavasant, P., Supaphol, P. (2007). Osteoblastic phenotype expression of MC3T3-E1 cultured on electrospun polycaprolactone fiber mats filled with hydroxyapatite nanoparticles. *Biomacromolecules*, Vol. 8, p. 2602-2610
- Xiao, Y. T., Gopalakrishnan, R., Jiang, D., Reith, E., Benson, M. D., Francheschi, R. T. (2002). Bone morphogenetic proteins, extracellular matrix, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways are required for osteoblast-specific gene expression and differentiation in MC3T3-E1 cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol. 17, p. 101-110
- Xiong, J. -P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R., Scott, D. L., Joachimiak, A., Goodman, S. L., Arnaout, M. A. (2001). Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha\beta3$. *Science*, Vol. 294, p. 339-345
- Xu, D. J., Zhao, Y. Z., Wang, J., He, J. W., Weng, Y. G., Luo, J. Y. (2012). Smads, p38 and ERK1/2 are involved in BMP9-induced osteogenic differentiation of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells. *BMB Reports*, Vol. 45, p. 247-252
- Yamaguchi, K., Nagai, S.-i., Ninomiya-Tsuji, J., Nishita, M., Tamai, K., Irie, K., Ueno, N., Nishida, E., Shibuya, H., Matsumoto, K. (1999). XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. *European Molecular Biology Organization*, Vol. 18, p. 179-187
- Yamaguchi, A., Komori, T., Suda, T. (2000). Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocrine Reviews Communication*, Vol. 21, p. 393-411
- Yamamoto, M., Yamato, M., Aoyagi, M., Yamamoto, K. (1995). Identification of integrins involved in cell adhesion to native and denatured type I collagens and the phenotypic transition of rabbit arterial smooth muscle cells. *Experimental cell research*, Vol. 219, p. 249-256

- Yan, Y. X., Gong, Y. W., Guo, Y., Lv, Q., Guo, C., Zhuang, Y., Zhang, Y., Li, R., Zhang, X. Z. (2012). Mechanical strain regulates osteoblast proliferation through integrin-mediated ERK activation. *PLoS ONE*, Vol. 7, p. e35709
- Yang, Y., Cui., Q., Sahai, N. (2010). How does bone sialoprotein promote the nucleation of hydroxyapatite? A molecular dynamics study using model peptides of different conformations. *Langmuir*, Vol. 26, p. 9848-9859
- Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S. -i., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N., Takahashi, N., Suda, T. (1998). Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 95, p. 3597-3602
- Yeh, C. C., Chen, C. N., Li, Y. T., Chang, C. W., Cheng, M. Y., Chang, H. I. (2011). The effect of polymer molecular weight and UV radiation on physical properties and bioactivities of PCL films. *Cellular Polymers*, Vol. 30, p. 227-242
- Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R., Geiger, B. (2007). Functional atlas of the integrin adhesome. *Nature Cell Biology*, Vol. 9, p. 858-867
- Zenkiewicz, M., Richert, A., Malinowski, R., Moraczewski, K. (2013). A comparative analysis of mass losses of some aliphatic polyesters upon enzymatic degradation. *Polymer Testing*, Vol. 32, p. 209-214
- Zhang, Y., Chang, C., Gehling, D. J., Hemmati-Brivanlou, A., Derynck, R. (2001). Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, Vol. 98, p.974-979
- Zhang, H., Hollister, S. (2009). Comparison of bone marrow stromal cell behaviors on poly(caprolactone) with or without surface modification : studies on cell adhesion, survival and proliferation. *Journal of Biomaterial Science Polymer Edition*, Vol. 20, p. 1975-1993

- Zhang, H., Lin, C. Y., Hollister, S. J. (2009a). The interaction between bone marrow stromal cells and RGD-modified three-dimensional porous polycaprolactone scaffolds. *Biomaterials*, Vol. 30, p. 4063-4069
- Zhang, M., Yan, Y., Lim, Y. B., Tang, D., Xie R., Chen A., Tai, P., Harris, S. E., Xing, L., Qin, Y. X., Chen, D. (2009b). BMP-2 modulates β -catenin signaling through stimulation of LRP5 expression and inhibition of β -TrCP expression in osteoblasts. *Journal of Cellular Biochemistry*, Vol. 108, p. 896-905
- Zhang, W., Deng, Z. L., Chen, L., Zuo, G. W., Luo, Q., Shi, Q. (2010). Retinoic acids potentiate BMP-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. *PLoS ONE*, Vol. 5, p. e11917
- Zhang, P., Wu, H., Wu, H., Lù, Z., Deng, C., Hong, Z., Jing, X., Chen, X. (2011). RGD-conjugated copolymer incorporated into composite of poly(lactide-co-glicotide) and poly(L-lactide)-grafted nanohydroxyapatite for bone tissue engineering. *Biomacromolecules*, Vol.12, p. 2667-2680
- Zhang, C., Li, Y., Cornelia, R., Swisher, S., Kim, H. (2012a). Regulation of VEGF expression by HIF-1 α in the femoral head cartilage following ischemia osteonecrosis. *Scientific Reports*, Vol. 2, p. 650
- Zhang, F., Ren, L. F., Lin, H. S., Yin, M. N., Tong, Y. Q., Shi, G. S. (2012b). The optimal dose of recombinant human osteogenic protein-1 enhances differentiation of mouse osteoblast-like cells: An in vitro study. *Archive of Oral Biology*, Vol. 57, p. 460-468
- Zhang, R., Oyajobi, B. O., Harris, S. E., Chen, D., Tsao, C., Deng, H. W., Zhao, M. (2013). Wnt/ β -catenin signaling activates bone morphogenetic protein 2 expression in osteoblasts. *Bone*, Vol. 52, p. 145-156
- Zhao, G. Q., Hogan, B. L. M. (1996). Evidence that mouse Bmp8a (Op2) and Bmp8b are duplicated genes that play a role in spermatogenesis and placental development. *Mechanisms of Development*, Vol. 57., p. 159-168

- Zhao, G. Q., Chen, Y. X., Liu, X. M., Xu, Z. S., Qi, X. X. (2001). Mutation in Bmp7 exacerbates the phenotype of Bmp8a mutants in spermatogenesis and epididymis. *Developmental Biology*, Vol. 240, p. 212-222
- Zhao, H., Ross, F. P. (2007). Mechanisms of osteoclastic secretion. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 1116, p. 238-244
- Zhao, Q., Shao, J., Chen, W., Li, Y. P. (2007). Osteoclast differentiation and gene regulation. *Frontiers in Bioscience*, Vol. 12, p. 2519-2529
- Zhou, Q., Xanthos, M. (2008). Nanoclay and crystallinity effects on the hydrolytic degradation of polylactides. *Polymer Degradation and Stability*, Vol. 93, p. 1450-1459
- Zimmerman, L. B., De Jesus-Escobar, J. M., Harland, R. M. (1996). The spermann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell*, Vol. 86, p. 599-606