N° d'ordre NNT : **2021LYSES024**

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Jean Monnet Saint-Etienne
INSERM U1059 – SAINBIOSE
Laboratoire de Biologie des Tissus Ostéo-articulaires (LBTO)

Ecole Doctorale n°488
Sciences Ingénierie Santé – EDSIS 488

Spécialité de doctorat : Biologie, Médecine, Santé
Discipline : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Soutenue publiquement le 29/09/2021, par :

Mathieu Maalouf

Rôles de l'ostéopontine et de la sialoprotéine osseuse dans la réponse du squelette aux contraintes mécaniques

Devant le jury composé de :

Dr. Valérie GEOFFROY, Directrice de Recherche DR2, INSERM, UMR_S1229 RMeS « Regenerative Medicine and skeleton », Nantes, France **– Présidente**

Pr. Chantal CHENU, Professor of Skeletal Biology, The Royal Veterinary College, Department of Biomedical Sciences, London, United Kingdom – **Rapporteur**

Dr. Nicolas BONNET, Senior Scientist in bone and join physiology, Nestlé research center, Lausanne, Switzerland – **Rapporteur**

Dr. Claire MORIN, Maître de Conférences, Centre Ingénierie et Santé, ENMSE, Saint-Etienne, France – **Examinatrice**

Dr. Alain GUIGNANDON, Maître de Conférences, U1059 INSERM, SAINBIOSE, LBTO, UJM, Saint-Etienne, France – **Co-directeur de thèse**

Dr. Luc MALAVAL, Chargé de Recherche Hors Classe, U1059 INSERM, SAINBIOSE, LBTO, UJM, Saint-Etienne, France – **Directeur de thèse**

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier le Pr. Chantal CHENU et le Dr. Nicolas BONNET pour avoir accepté d'être rapporteurs et d'évaluer ma thèse. De même, je remercie le Dr. Valérie GEOFFROY d'avoir accepté d'être présidente du jury.

Je remercie le Dr. Laurence VICO, directrice du laboratoire, pour son accueil au sein de son unité. Je la remercie également pour ses conseils, ses encouragements et sa gentillesse. Je tiens de même à la remercier pour ses différentes idées et remarques très pertinentes qui ont amélioré mes travaux.

Je remercie tout particulièrement le Dr. Luc MALAVAL, directeur de ma thèse, pour sa grande disponibilité, son aide et sa gentillesse. C'est un honneur pour moi d'avoir effectué ma thèse auprès d'un chercheur si brillant et si humble. Je le remercie de m'avoir appris autant de choses sur la biologie de l'os, sur le métier de chercheur mais aussi sur beaucoup d'autres domaines ! Ce fut impressionnant de constater cette connaissance encyclopédique sur d'innombrables sujets. Les références aux romans de Pratchett vont bien me manquer (même si je ne les ai pas toutes comprises).

Je remercie chaleureusement le Dr. Alain GUIGNANDON, co-directeur de ma thèse, pour son enthousiasme, ses conseils et ses innombrables idées. Ce fut un plaisir de discuter ostéocytes, et de les imiter de temps en temps, pour essayer de comprendre leur fonctionnement. Je le remercie également pour ses multiples suggestions et conseils qui m'ont permis d'améliorer les analyses de mes données et d'avoir des approches créatives. L'aventure continue avec un joli post-doc qui je pense sera bien fructifiant !

Je remercie également Arnaud VANDEN-BOSSCHE pour ses nombreuses aides depuis le début de ma thèse avec la mise en place de la plateforme de vibration, les lancements de la grande centrifugeuse, les manipulations de souris et l'histologie innovante de l'os. C'est une chance pour nous d'avoir une personne aussi créative et pleine d'énergie au laboratoire !

Je remercie le Pr. Marie-Hélène LAFAGE-PROUST pour ses excellents conseils, ses encouragements et sa constante bonne humeur. C'étais toujours un plaisir de discuter avec une personne aussi cultivée scientifiquement mais aussi dans beaucoup d'autres domaines. Merci aussi d'avoir assisté à l'un de mes concerts et d'apprécier le son de ma cornemuse !

Je remercie le Dr. Bernard ROCHE pour ses bons conseils mais aussi pour les très agréables discussions qui se terminent souvent en fou rire ! Ce fut une grande joie d'avoir joué avec les coiffeurs pour dames ! Merci aussi de nous avoir initié au jeu de la Battle Wikipédia.

Je remercie Mireille PAUL pour sa grande aide en bio-mol et pour sa gentillesse. Son énergie débordante a toujours été au rendez-vous ! C'était toujours un plaisir de travailler avec toi et de voir ta précision millimétrée dans tous tes gestes techniques.

Je remercie le Dr. Marie-Thérèse LINOSSIER pour ses bons conseils, ses explications des analyses moléculaires et pour le design de primers. Nos discussions ont toujours été passionnantes.

Je remercie Sylvie PEYROCHE pour son aide pendant les dissections. L'aventure continue avec pleins de cellules à cultiver pendant mon post-doc. On jouera à la bataille navale sur les plaques de 96 puits !

Je remercie Norbert LAROCHE pour les coupes en MMA et de m'avoir montré les techniques d'histologie.

Je ne remercierai jamais assez mes amis doctorants pour leurs aides et leur bonne humeur qui a rendu le quotidien au laboratoire très agréable.

Merci Mélanie de m'avoir accueilli à mon arrivée et de m'avoir aidé pour pleins de choses. Ta connaissance légendaire de l'historique du laboratoire et de tout ce qui se passe à chaque moment m'a toujours impressionné. On est perdu depuis que tu es partie loin au Nord !

Merci Robin pour les diverses discussions scientifiques toujours intéressantes ! C'était un plaisir d'avoir pu assister à ton mariage, je vous souhaite du bonheur et de la réussite à toi et à madame pour la suite !

Merci Laura pour les Macros ImageJ et pour la machine à popcorn. C'est tout. Non je plaisante, c'était un vrai plaisir de discuter et surtout de se taquiner. Nos inoubliables soirées CTR sont à refaire ! Merci aussi pour les nombreux conseils et les aides en manip !

Enfin une des dernières arrivées, Elsa, ou Alix, ou Elise ou encore Elisa, peu importe. Merci pour ta grande aide en cette fin de thèse et pour les discussions interminables et toujours intéressantes qu'on a pu avoir ! Tu vas me voir plus souvent roder en culture cell dès à présent ! À tout à l'heure.

Merci à tout le reste de l'équipe pour leur sympathie et pour toutes les discussions qu'on a pu avoir durant ces 3 années !

SOMMAIRE

Liste des abréviations 6
Liste des figures et des tableaux 8
Introduction générale 12
I) Revue bibliographique : Physiologie osseuse et réponse aux contraintes mécaniques 14
A. Le tissu osseux 14
1. Architecture générale des os 14
2. Structure du tissu osseux 17
a. La matrice osseuse 17
b. Les cellules osseuses 17
c. Les types de tissus osseux 20
3. Physiologie du tissu osseux 21
a. Le développement osseux 21
b. Le modelage osseux 21
c. Le remodelage osseux 24
B. Contraintes mécaniques et os 25
1. Adaptation de l'os aux contraintes mécaniques 26
2. Contraintes mécaniques appliquées sur modèle animal 28
a. Modèles de contrainte appliquée sur le corps entier 29
b. Modèles de contrainte appliquée sur une pièce osseuse spécifique 34
3. Transduction du signal mécanique : rôle des ostéocytes 37
a. Perception du signal mécanique par les ostéocytes 38
b. Réponse ostéocytaire aux signaux mécaniques 41
c. Effets des contraintes mécaniques sur l'intégrité du réseau ostéocytaire 42
C. Les protéines SIBLING, des composants majeurs de la matrice osseuse 43
1. La sialophosphoglycoprotéine dentinaire (dentin sialophosphoglycoprotein, DSPP) 44
2. La phosphoglycoprotéine matricielle (matrix extracellular phosphoglycoprotein, MEPE) 44
3. La proteine matricielle dentinaire-1 (Dentin Matrix Protein 1, DMP1) 45
4. La sialoprotéine osseuse (bone sialoprotein, BSP) 46
5. L'ostéopontine (osteopontin, OPN) 47
D. Interactions fonctionnelles entre l'ostéopontine et la sialoprotéine osseuse 48
E. L'ostéopontine et la sialoprotéine osseuse sous contrainte mécanique 52
F. Objectifs de la thèse 54
II) Travaux réalisés 55
A. Evidence of interplay between Osteopontin and Bone Sialoprotein in the skeletal response to mechanical stimulation: single and double knockout mice under hypergravity and whole body vibration (article en cours de publication) 56

B. La vibration corps entier induit des effets opposés sur la dynamique de formation et les paramètres architecturaux des lacunes ostéocytaires chez les souris déficientes en Ostéopontine ou en Sialoprotéine osseuse (article en préparation) 86
1. Contexte de l'étude 86
2. Matériels et méthodes 88
a. Vibration du corps entier 88
b. Protocole d'injection de fluorochromes 88
c. Mise à mort et prélèvement 89
d. Imagerie de l'os cortical 89
e. Analyse des dynamiques corticales 90
f. Mesures effectuées pour comparer les génotypes à l'état de base 91
g. Mesures effectuées pour déterminer l'effet de la vibration 94
h. Analyse des réseaux lacuno-canaliculaires 95
i. Statistiques 98
3. Résultats 99
a. Dynamiques de base des différents génotypes dans le compartiment antérieur de l'os cortical 99
b. Dynamiques de base des différents génotypes dans le compartiment postérieur de l'os cortical 102
c. Effet de la vibration du corps entier sur la formation osseuse corticale 104
d. Effets de la vibration du corps entier sur le système lacuno-canliculaire 106
4. Discussion 111
5. Données supplémentaires 115
III) Discussion générale et perspectives 120
IV) Bibliographie 124
V) Annexes méthodologiques 141
A. Histomorphométrie de l'os cortical inclus en méthyl-méthacrylate 141
B. Paramètres d'acquisition des tranches d'os cortical multimarqué au microscope confocal à l'objectif 20X 147
C. Paramètres d'acquisition du réseau lacuno-canaliculaire au microscope confocal à l'objectif 63X.. 148
D. Quantification de la dynamique corticale avec ImageJ 149
E. Sélection et isolement d'une région d'intérêt du réseau lacuno-canaliculaire avec ImageJ 150
F. Segmentation du réseau lacuno-canaliculaire avec ImageJ 152
G. Analyse du réseau lacuno-canaliculaire avec ImageJ 154
VI) Annexes communication 160

Liste des abréviations

ASARM : Acidic Serine Asparte-Rich Motif

AZ : AliZarine

BFR/BPm : Bone Formation Rate per Bone Perimeter

BMD : Bone Mineral Density

BMPs : Bone Morphogenetic Proteins

BSP : Bone SialoProtein

BV/TV : Bone Volume / Total Volume

CB : Calcein Blue

CD44 : Cluster of Differentiation 44

Cn.Frac.Ar : Canalicular Fraction Area

Cn.Junc/Cn.Ar : Canalicular Junction per Canalicular Area

Cn.Le/Cn.Ar : Canalicular Length per Canalicular Area

Cn.N/Cn.Ar : Canalicular Number per Canalicular Area

Coll 1 : Collagène de type 1

Cox-2 : CycloOXygénase 2

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

CSS : Cellules Souches Squelettiques

CT : Contrôle

Cx43 : Connexine 43

DD-2 : Dysplasie de la Dentine de type 2

DGI : DentinoGenèses Imparfaites

DGP : Dentine GlycoProtéine

DKK1 : DicKKopf-related protein 1

DKO : Double KnockOut

DMP1 : Dentin Matrix Protein 1

DPP : Dentine PhosphoProtéine

DSP : Dentine SialoProtéine

DSPP : Dentin SialoPhosphoglycoProtein

FGF : Fibroblast Growth Factors

FGF23 : Fibroblast Growth Factor 23

FZD : FriZzelD

G : accélération

GSK3 : Glycogen Synthase Kinase 3

HAP : HydroxyAPatite

HG : HyperGravité

Hz : Hertz

Ibsp : Integrin-binding sialoprotein

IGF-1 : Insulin-like Growth Factor-1

kDa : KiloDalton

KO : KnockOut

L_0 : Longueur initiale

Lc.Ar : Lacunar Area

Lc.Frac.Ar : Lacunar Fraction Area

Lc.Major Axis : Lacunar Major Axis

Lc.Minor Axis : Lacunar Minor Axis

Lc.Round : Lacunar Roundness

LCN : Lacuno-Canalicular Network

LRP : Low-density lipoprotein Receptor-related Protein

MAR : Mineral Apposition Rate

M-CSF : Macrophage Colony-Stimulating Factor

MEPE : Matrix Extracellular PhosphoglycoprotEin

Mpm/BPm : Mineralized Perimeter per Bone Perimeter

N.Lc/B.Ar : Lacunar Number per Bone Area

N/m^2 : Newton par mètre carré

NFATC-2 : Nuclear Factor of Activated T-cells Cytoplasmic 2

NO : Nitric Oxyde

Oc.S/BS : Osteoclastic Surface per Bone Surface

OCN : OsteoCalciN

OPG : OsteoProteGerine

OPN : OsteoPontiN

OSX : OSteriX / Sp7

Pa : Pascals

PAL : Phosphatase ALcaline

PGE_2 : ProstaGlandinE 2

PGs : Petits Protéoglycanes

PHEX : PHosphate-regulating gene with homology to Endopeptidases on X-chromosome

PNC : Protéines « Non-Collagéniques »

Ptger2/4 : Prostaglandin E2/4 receptor

PTH : ParaThyroïd Hormone

RANKL : Receptor Activator of Nuclear factor κB Ligand

RGD : Arginine-Glycine-Aspartate

Runx2 : Runt-related transcription factor 2

SCLN : SCLerostiN

SIBLING : Small Integrin Binding LIgand N-linked Glycoprotein

siOPN : siRNA ciblant l'OPN

siRNA : Small interfering RNA

Sox9 : SRY-bOX transcription factor 9

Spp1 : Secreted phosphoprotein 1

TALEN : Transcription Activator-Like Effector Nuclease

Tb.N : Trabecular Number

TGF-β : Transforming Growth Factor-β

TRAcP : Tartrate-Resistante Acid Phosphatase

VB : Vibré

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

Vmax : Vitesse maximale

VO_2 max : Volume de consommation maximale d'Oxygène

WBV : Whole Body Vibration

Wnt : Famille de protéines Wingless

WT : Wild Type

YAP : Yes-Associated Protein-1

ΔL : Variation de longueur

ε : Epsilon

Liste des figures et des tableaux

Figures principales

Figure 1 : Anatomie macroscopique d'un os long. Tortora et. al., 1994. 15

Figure 2 : Anatomie macroscopique et microscopie des différents compartiments d'un os long (humérus humain). Source: Mescher et al., in Junqueira's Basic Histology, 13th Edition, McGraw-Hill Education, 2013. 16

Figure 3 : Régulation des activités ostéoblastiques et ostéoclastiques par les ostéocytes. Dallas S. L., et al., 2021. 19

Figure 4 : Processus de digestion de la matrice osseuse par un ostéoclaste. Roy et.al., 2020. 20

Figure 5 : Illustration du modelage de l'extrémité d'un os long durant la croissance en longueur. Allen et al., 2014. 22

Figure 6 : Illustration du modelage d'un fragment diaphysaire en croissance radiale. Allen et al., 2014. 22

Figure 7 : Image et illustration du « drift » osseux d'un cubitus (à gauche) et d'un radius (à droite) de souris. Différents fluorochromes ont été injectés presque toutes les semaines de l'âge de 3 semaines et demie à l'âge de 13 semaines. Allen et al., 2014 23

Figure 8 : Illustration d'un os cortical en « drift » avec l'axe de neutralité mécanique. 24

Figure 9 : Illustration des différentes étapes du remodelage osseux. Truesdell et al., 2020. 25

Figure 10 : Organisation de l'os trabéculaire dans plusieurs pièces osseuses humaines d'individus d'âges différents (à gauche) et représentation des forces et des trajectoires à l'intérieur de l'os trabéculaire (à droite). Images reproduites depuis Wolff J., Virchow's Arch Pathol. Anat. Physiol. 1870; 50:389–450, ré-imprimés dans Clin. Orthop. Rel. Res. 2010; 468:1056–1065. 26

Figure 11: Illustration de la théorie du mécano-stat de Frost. Stanford et al., 1999. 27

Figure 12 : Relation entre l'amplitude de la déformation, la fréquence et l'adaptation osseuse dans un modèle de contrainte mécanique ciblé sur le cubitus de dinde. Ozcivici et. al., 1998. 28

Figure 13 : Effet de 2 semaines d'hyper-gravité à 2G sur les paramètres architecturaux du réseau trabéculaire métaphysaire de l'humérus proximal (A), du fémur distal (B) et du tibia proximal (C) chez des souris mâles. Tominari et al., 2019. 31

Figure 14 : Effet de 3 semaines d'hypergravité à 2G sur le nombre de trabécules (Tb.N), la fraction volumique (BV/TV) et les surfaces ostéoclastiques (Oc.S/BS) de l'os trabéculaire du fémur distal et de la vertèbre L2 chez des souris mâles. Gnyubkin et al., 2015. 31

Figure 15 : Effets ostéogéniques théoriques des configurations faible amplitude/haute fréquence, moyenne amplitude/moyenne fréquence et forte amplitude/faible fréquence. Hart et. al., 2017. 33

Figure 16 : Effet de la vibration corps entier à 0,7G et à 8, 52 et 90Hz pendant 10 minutes par jour, 5 jour par semaines durant 4 semaines sur l'épaisseur (figure de haut) et la porosité (figure de bas) de l'os cortical du fémur de rat. Pasqualini et. al., 2013. 34

Figure 17 : Effet de la vibration corps entier à 2G et 90Hz pendant 15 minutes par jour, 5 jours par semaine durant 3 ou 9 semaines sur l'épaisseur (a) et l'aire (b) de l'os cortical de fémur de souris. Gnyubkin et. al., 2016. 34

Figure 18 : Placement des jauges de contraintes pour la calibration de la compression axiale du tibia. Main et. al., 2020. 37

Figure 19 : Principaux mécano-senseurs structuraux des ostéocytes et du système lacuno-canaliculaire. Qin et. al., 2020. 40

Figure 20 : Principales voies de signalisation de la mécano-transduction ostéocytaire. Qin et. al., 2020. 42

Figure 21 : La phosphorylation de DMP1 sur son motif ASARM provoque la formation d'un complexe αvβ3/DMP1/PHEX. Ce complexe est inhibiteur de la production de FGF23 par les ostéocytes. D'après Rowe et. al., 2012b. 45

Figure 22 : Effets de l'injection de siOPN sur l'effet anabolique de la PTH sur la calvaria de souris WT et $BSP^{-/-}$. Bouleftour et. al., 2015. 50

Figure 23 : Expression des marqueurs osseux dans l'os cortical de souris WT, $OPN^{-/-}$, $BSP^{-/-}$ et DKO âgées de 2 mois. Bouleftour et al., 2019. 51

Figure 24 : Fermeture de la suture sagittale du crâne induite par expansion forcée chez des souris WT et $OPN^{-/-}$. Les images du haut sont des représentations 3D des sutures. Le graphe de gauche représente le volume osseux. Le graphe de droite représente l'aire de l'espace entre les deux os pariétaux. Morinobu et. al., 2003. 52

Figure 25 : Plan expérimental utilisé in vivo pour la réalisation d'un multi-marquage au rouge d'alizarine (AZ) et au bleu de calcéine (CB) avant et pendant le protocole de vibration. 88

Figure 26 : Image d'une tranche d'os cortical d'une souris ayant subi le protocole de multi-marquage au rouge d'alizarine et au bleu de calcéine. Les lignes bleues correspondent aux injections de bleu de calcéine. Les lignes orange continues sur l'os correspondent aux injections d'alizarine. Les lignes orange discontinues ont été complétées par traçage manuel pour illustrer la résorption théorique qui a eu lieu au cours du drift. La direction de ce dernier est indiquée par la flèche blanche continue représentée au milieu de la moelle. La double flèche en pointillé visualise l'axe de neutralité mécanique qui correspond à la limite virtuelle entre, d'une part, une formation endostée et une résorption périostée situées majoritairement sur la partie antérieure de l'os (nommé compartiment antérieur), et d'autre part, une formation périostée et une résorption endostée situées sur la partie postérieure de l'os (nommé compartiment postérieur). 90

Figure 27 : Illustration de la délimitation de la ligne de neutralité mécanique (image du haut) et de la normalisation de l'aire d'os déposé entre 2 lignes de marquage (en jaune) sur l'aire du compartiment auquel elle appartient (ici, le compartiment antérieur, zone de formation endostée, image du bas). 93

Figure 28 : Illustration de la normalisation des aires de formation. L'image représente un fragment de la partie antérieure de l'os cortical, avec une formation sur le côté endosté. Les lignes d'injections de rouge d'alizarine (en orange) et de calcéine (en bleu) sont identifiées par le moment où ils ont été injecté en semaine d'âge (noté S.). Les injections ont été réalisées aux semaines 5, 7, 8, 10, 11, 12 et 13. La vibration a débuté à la semaine 8 et s'est terminée à la semaine 14 (bord osseux). L'aire déposée entre les semaines 7 et 8 a servi de référence pour la normalisation des aires d'os déposées pendant le régime vibratoire. Cette référence a été nommée S0 (semaine 0). 94

Figure 29 : Principales étapes du protocole d'analyse du réseau lacuno-canaliculaire formé durant les deux premières semaines de vibration. 97

Figure 30 : Exemple de coupes d'os corticaux de fémurs de souris WT, $OPN^{-/-}$, $BSP^{-/-}$ et DKO ayant subi le protocole de multimarquage. 99

Figure 31 : Formation endostée des souris contrôle des génotypes WT, $OPN^{-/-}$, $BSP^{-/-}$ et DKO en valeurs brutes (A), en valeurs brutes cumulées (B), en valeurs cumulées normalisées par l'aire du compartiment antérieur (C) et normalisées par l'aire de la semaine S0 (D). A-C : Sx-Sy indique les semaines de vie où ont été injecté les marquages délimitant l'aire prise en compte ; D : Sx : semaine après S0. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ETM. Sur la droite, pour chaque graphique, les valeurs du test F de l'ANOVA 2 (en gras si $p<0,05$), n=6 souris / génotype. 101

Figure 32 : Formation périostée des souris contrôle des génotypes WT, $OPN^{-/-}$, $BSP^{-/-}$ et DKO en valeurs brutes (A), en valeurs brutes cumulées (B), en valeurs cumulées normalisées par l'aire du compartiment postérieur (C) et normalisées par l'aire de la semaine S0 (D). A-C : Sx-Sy indique les semaines de vie où ont été injecté les marquages délimitant l'aire prise en compte ; D : Sx : semaine

après S0. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ETM. Sur la droite, pour chaque graphique, les valeurs du test F de l'ANOVA 2 (en gras si p<0,05), n=6 souris / génotype. 103

Figure 33 : Formation endostée cumulée, normalisée par l'aire de la semaine S0 (dernière semaine avant vibration), pour les souris WT, $OPN^{-/-}$, $BSP^{-/-}$ et DKO des groupes contrôles (CT) et vibrés (VB). Sx : semaine de vibration. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Sur la droite, pour chaque graphique, les valeurs du test F de l'ANOVA 2 (en gras si p<0,05), n=6 souris / génotype. 105

Figure 34 : Densité (Lc.N/B.Ar) et aire moyenne (Lc.Ar) des lacunes ostéocytaires dans le compartiment cortical antérieur de souris WT, $OPN^{-/-}$, $BSP^{-/-}$ et DKO des groupes contrôle (CT) et vibré (VB), mesurées dans l'os formé au cours des deux premières semaines (S8-S10) et des quatre dernières semaines (S10-S14) du protocole WBV. *p<0,05 ;**p<0,01 entre mutants et WT de la même période, $^{\$}$p<0,05 ; $^{\$\$}$p<0,01 entre S8-S10 et S10-S14 pour les CT de chaque génotype, $^{\#}$p<0,05 entre CT et VB pour chaque génotype, test U de Mann-Whitney, n=6 souris/groupe. Les cadres verts soulignent les effets de la WBV. 107

Figure 35 : Axe majeur (Lc. Major Axis) et axe mineur (Lc Minor Axis) des lacunes ostéocytaires dans le compartiment antérieur de souris WT, $OPN^{-/-}$, $BSP^{-/-}$ et DKO groupes contrôle (CT) et vibré (VB), mesurées dans l'os formé au cours des deux premières semaines (S8-S10) et des quatre dernières semaines (S10-S14) du protocole WBV. **p<0,01 entre mutants et WT de la même période, $^{\$\$}$p<0,01 entre S8-S10 et S10-S14 pour les CT de chaque génotype, $^{\#}$p<0,05 entre CT et VB pour chaque génotype, test U de Mann-Whitney, n=6 souris/groupe. Le cadre vert souligne l'effet de la WBV..... 108

Figure 36 : Images d'une partie du réseau lacuno-canaliculaire des souris $BSP^{-/-}$ et $OPN^{-/-}$ en condition contrôle (CT) et vibrée (VB). Pour chaque image, la ligne blanche discontinue indique la position de la ligne d'injection S10 réalisée après 2 semaines de WBV. Les doubles flèches blanches et jaunes indiquent les périodes S8-S10 et S10-S14, respectivement. 109

Figure 37 : Fraction d'aire canaliculaire (Cn.Frac.Ar), nombre de canalicule (Cn.N / Cn.Ar) et nombre de jonction canaliculaire (Cn.Junc / Cn.Ar) par aire canaliculaire dans le compartiment antérieur de souris WT, $OPN^{-/-}$, $BSP^{-/-}$ et DKO groupes contrôle (CT) et vibré (VB), mesurées dans l'os formé au cours des deux premières semaines (S8-S10) et des quatre dernières semaines (S10-S14) du protocole WBV. *p<0,05 entre mutants et WT de la même période, $^{\$}$p<0,05 ; $^{\$\$}$p<0,01 entre S8-S10 et S10-S14 pour les CT de chaque génotype, $^{\#}$p<0,05 ; $^{\#\#}$p<0,01 entre CT et VB pour chaque génotype, test U de Mann-Whitney, n=6 souris/groupe. Les cadres vert soulignent les effets de la WBV..... 110

Tableaux

Tableau 1: Modèles de contraintes mécaniques localisées. (A) Contrainte axiale sur tibia via des câbles placés chirurgicalement. (B) Contrainte sur le cubitus de volailles isolé chirurgicalement. (C) Flexion sur 4 points sur tibia de rongeurs. (D) Flexion sur tibia suspendu de souris. (E) Compression axiale sur cubitus de rongeur. (F) Compression axiale sur tibia de rongeur. (G) Compression vertébrale de rongeur. (H) compression sur le trabéculaire distal de fémur de lapin. D'après Main et. al., 2020. 36

Tableau 2 : Résumé des études ayant analysé l'effet de contraintes mécaniques in vitro ou in vivo sur l'expression génique de l'OPN et de la BSP. 53

Figures supplémentaires

Figure S1 : Marquage TRAcP (image de gauche) et double marquage tétracycline (image de droite) sur une même zone d'une même tranche d'une coupe d'os cortical de souris DKO. Les petites flèches jaune, rouge et verte indiquent des foyers de résorption identifiés par le marquage TRAcP et ré-indiqués sur l'image de droite où les marquages tétracycline sont indiqués par des flèches blanches. Ces images proviennent des prises photographiques réalisées lors des analyses histomorphométriques de la première étude. 115

Figure S2: Formation périostée cumulée, normalisée par l'aire de la semaine S0 (dernière semaine avant vibration), pour les souris WT, $OPN^{-/-}$, $BSP^{-/-}$ et DKO des groupes contrôles (CT) et vibrés (VB). Sx : semaine de vibration. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Sur la droite, pour chaque graphique, les valeurs du test F de l'ANOVA 2 (en gras si p<0,05), n=6 souris / génotype. 116

Figure S3 : Fraction d'aire lacunaire (Lc.Frac.Ar) dans le compartiment antérieur de souris WT, $OPN^{-/-}$, $BSP^{-/-}$ et DKO groupes contrôle (CT) et vibré (VB), mesurées dans l'os formé au cours des deux premières semaines (S8-S10) et des quatre dernières semaines (S10-S14) du protocole WBV. **p<0,01 entre mutants et WT de la même période, $^{\$}$p<0,05 ; $^{\$\$}$p<0,01 entre S8-S10 et S10-S14 pour les CT de chaque génotype, $^{\#}$p<0,05 entre CT et VB pour chaque génotype, test U de Mann-Whitney, n=6 souris/groupe. Les cadres vert soulignent les effets de la WBV. 117

Figure S4 : Rondeur lacunaire (Lc.Round.) dans le compartiment antérieur de souris WT, $OPN^{-/-}$, $BSP^{-/-}$ et DKO groupes contrôle (CT) et vibré (VB), mesurées dans l'os formé au cours des deux premières semaines (S8-S10) et des quatre dernières semaines (S10-S14) du protocole WBV. *p<0,05 entre mutants et WT de la même période, $^{\$}$p<0,05 entre S8-S10 et S10-S14 pour les CT de chaque génotype, test U de Mann-Whitney, n=6 souris/groupe. 117

Figure S5 : Longueur canaliculaire par aire canaliculaire (Cn.Le / Cn.Ar) dans le compartiment antérieur de souris WT, $OPN^{-/-}$, $BSP^{-/-}$ et DKO groupes contrôle (CT) et vibré (VB), mesurées dans l'os formé au cours des deux premières semaines (S8-S10) et des quatre dernières semaines (S10-S14) du protocole WBV. *p<0,05 entre mutants et WT de la même période, $^{\$\$}$p<0,01 entre S8-S10 et S10-S14 pour les CT de chaque génotype, test U de Mann-Whitney, n=6 souris/groupe. 118

Figure S6 : A : Pourcentage d'os primaire dans les sections fémorales de 5 à 10 souris des deux âges et des deux sexes. Les valeurs individuelles des souris mâles (vert) et femelles (bleu) sont représentées par des points. Les valeurs de p vs WT des données appariées selon l'âge (pour les échantillons mixtes M+F) sont indiquées en rouge, les p entre les sexes ($BSP^{-/-}$, 4 mois) en bleu, les p vs WT des données appariés selon l'âge et le sexe ($BSP^{-/-}$, 4 mois) en vert ; les valeurs de p sont en gras si p≤0,05 ; test U de Mann-Whitney. B : Exemple de sélection de l'os total et de l'os primaire dans ImageJ (WT, mâle, 4 mois). (Malaval, Follet et al., article en préparation). 119

Introduction générale

L'os est un organe aux multiples morphologies, aussi intrigantes qu'esthétiques, dont l'ensemble constitue le squelette qui confère aux corps sa charpente et sa résistance. C'est un organe à l'apparence rigide et stable du fait de sa minéralisation mais qui, en réalité, possède une plasticité incroyable à travers sa capacité à se régénérer en permanence. Son renouvellement, ou remodelage, se traduit par une destruction de sa matrice par des cellules, les ostéoclastes, et une formation par d'autres, les ostéoblastes. Certains de ces derniers se trouvent piégés dans l'os qu'ils ont formé pour devenir des ostéocytes qui vont s'organiser en un réseau cellulaire au sein de l'os, semblable au réseau neuronal. L'ensemble des activités anaboliques et cataboliques quotidiennes permettent à l'os de réparer des micro- ou macro-fractures, de subvenir aux besoins du corps en minéraux ou de les stocker, mais aussi de s'adapter aux contraintes mécaniques. Ces derniers se manifestent tout d'abord par la gravité terrestre qui va obliger le squelette à être résistant pour supporter le poids du corps. Il s'y rajoute un ensemble de stimuli mécaniques journaliers, tel que la marche ou l'activité physique, qui vont pousser le squelette à se renouveler pour s'adapter. Le bon déroulement de ces processus biologiques réside dans le bon fonctionnement physiologique de l'os qui est tributaire des constituants de l'environnement osseux.

Dans ce contexte, une multitude de facteurs jouent un rôle dans ces évènements et ont été décrits et étudiés par les chercheurs au fil des années. Parmi ces facteurs, nous nous intéressons tout particulièrement à une famille de protéines nommée SIBLING (*Small Integrin Binding LIgand N-linked Glycoproteins*). Ces protéines sont regroupées sous ce nom pour souligner le lien de fratrie qui les unit du fait qu'elles partagent une origine phylogénétique commune qui les a gardé soudées jusqu'à ce jour, puisque leur gènes sont présents sur un même chromosome et sont alignés les uns à côté des autres. La famille SIBLING est composée de l'OPN (*OsteoPontiN*), la BSP (*Bone SialoProtein*), la DSPP (*Dentin SialoPhosphoProtein*), la DMP1 (*Dentin Matrix Protein 1*) et MEPE (*Matrix Extracellular PhosphoglycoprotEin*). Ces protéines possèdent la particularité d'être impliquées dans le remodelage et la minéralisation de l'os.

Notre laboratoire a récemment mis en évidence des mécanismes compensatoires et croisés entre l'OPN et la BSP dans la physiologie osseuse à travers, entre autre, des modèles de souris génétiquement modifiées qui n'expriment pas l'OPN, ou pas la BSP, ou aucune des deux. Parallèlement, plusieurs études ont décrit une expression rapide de ces deux protéines par les cellules osseuses lorsque celles-ci sont exposées à une contrainte mécanique que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. La combinaison de ces deux grandes informations nous a alors poussé à nous intéresser aux réponses osseuses que peuvent avoir nos souris génétiquement modifiées si elles sont sous contrainte mécanique. Le travail effectué a appliqué à nos lignées de souris génétiquement modifiées deux modèles de contraintes décrits dans notre laboratoire, la vibration du corps entier et l'hypergravité, et il s'est développé en une étude approfondie des effets de la vibration sur la dynamique osseuse au cours du temps couplée à l'analyse

de son impact sur le réseau ostéocytaire. Ce dernier est en effet de plus en plus décrit comme le chef d'orchestre des réponses du squelette aux contraintes mécaniques.

Nous commencerons par une revue bibliographique qui mettra en place les différents éléments biologiques de l'os, en partant de sa structure jusqu'à sa réponse aux contraintes mécaniques en passant par sa physiologie. Nous exposerons de même les principales connaissances sur les protéines SIBLING et leur rôle dans la biologie de l'os en nous concentrant tout particulièrement sur l'OPN et la BSP. Ensuite les travaux seront présentés sous forme d'un article en cours de publication, suivi des résultats de travaux ultérieurs qui le prolongent et l'approfondissent.

I) Revue bibliographique : Physiologie osseuse et réponse aux contraintes mécaniques

Chez l'Homme adulte, le système squelettique est composé de 206 os. Il se caractérise par ses propriétés mécaniques, étant donné qu'il constitue la charpente du corps, tout en assurant une protection des organes internes. Les os servent aussi de point d'insertion à d'autres structures telles que les tendons et les ligaments, lui conférant ainsi un rôle déterminant dans la fonction de locomotion. Il possède de même un rôle métabolique, en régulant l'équilibre phosphocalcique de l'organisme par sa capacité de stockage et de libération du calcium et du phosphate, et un rôle endocrinien, par la sécrétion d'hormones et de facteurs de croissance. De plus, il abrite la moelle osseuse hématogène lui conférant un rôle dans l'hématopoïèse, c'est-à-dire l'ensemble des mécanismes assurant la production des cellules sanguines.

Les os sont constitués de plusieurs tissus : le tissu osseux, le tissu cartilagineux, les vaisseaux sanguins et le tissu nerveux, auxquels s'ajoutent les multiples lignages cellulaires présents dans la moelle osseuse. Le tissu osseux est un tissu conjonctif caractérisé par une matrice abondante, rigide et minéralisée.

A. Le tissu osseux

1. Architecture générale des os

D'un point de vue anatomique, les os sont classés en 3 catégories : les os dits courts (vertèbres, os du carpe et du tarse), les os longs (os des membres comme le fémur et le tibia) et les os plats (partie de l'omoplate et os de la voûte crânienne). Les os dits courts ainsi que les os longs sont composés de deux épiphyses (ce sont les extrémités), d'une diaphyse (partie médiane sous forme de cylindre creux) et de deux métaphyses (parties coniques présentes entre chaque épiphyse et la diaphyse), comme le montre la figure 1.

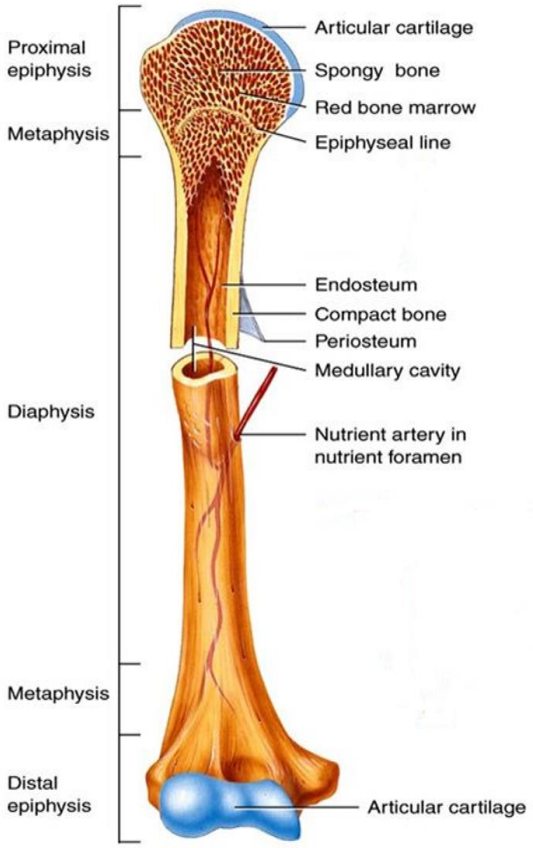


Figure 1 : Anatomie macroscopique d'un os long. Tortora et. al., 1994.

Il existe 2 grands types d'organisation du tissu osseux (Figure 2) :

- L'os trabéculaire qui est formé d'un réseau de travées séparées par de la moelle osseuse et dont l'orientation, la forme et l'épaisseur sont fonctions des contraintes mécaniques. Il remplit les os courts (vertèbres) et les os plats, ainsi que l'épiphyse et la métaphyse des os longs. C'est un compartiment osseux qui possède une dynamique de renouvellement élevée, lui conférant un rôle important dans le métabolisme phosphocalcique.
- L'os cortical constitue l'enveloppe des os qui enclot la cavité médullaire (Figure 2). Il a une structure compacte et est constitué chez l'Homme de formations circulaires juxtaposées composées de lamelles concentriques, les ostéons. L'os cortical est bordé sur la face externe de l'os par des membranes conjonctives qui constituent le périoste, et sur sa face interne (endoste) il est en contact avec la cavité médullaire. L'os cortical est traversé par un réseau complexe de canaux permettant l'accès aux ostéons de vaisseaux sanguins qui sont anastomosés avec la vascularisation de la cavité médullaire et du périoste. Sa dynamique de renouvellement est généralement inférieure à la dynamique trabéculaire et son rôle majeur est la résistance aux contraintes mécaniques.

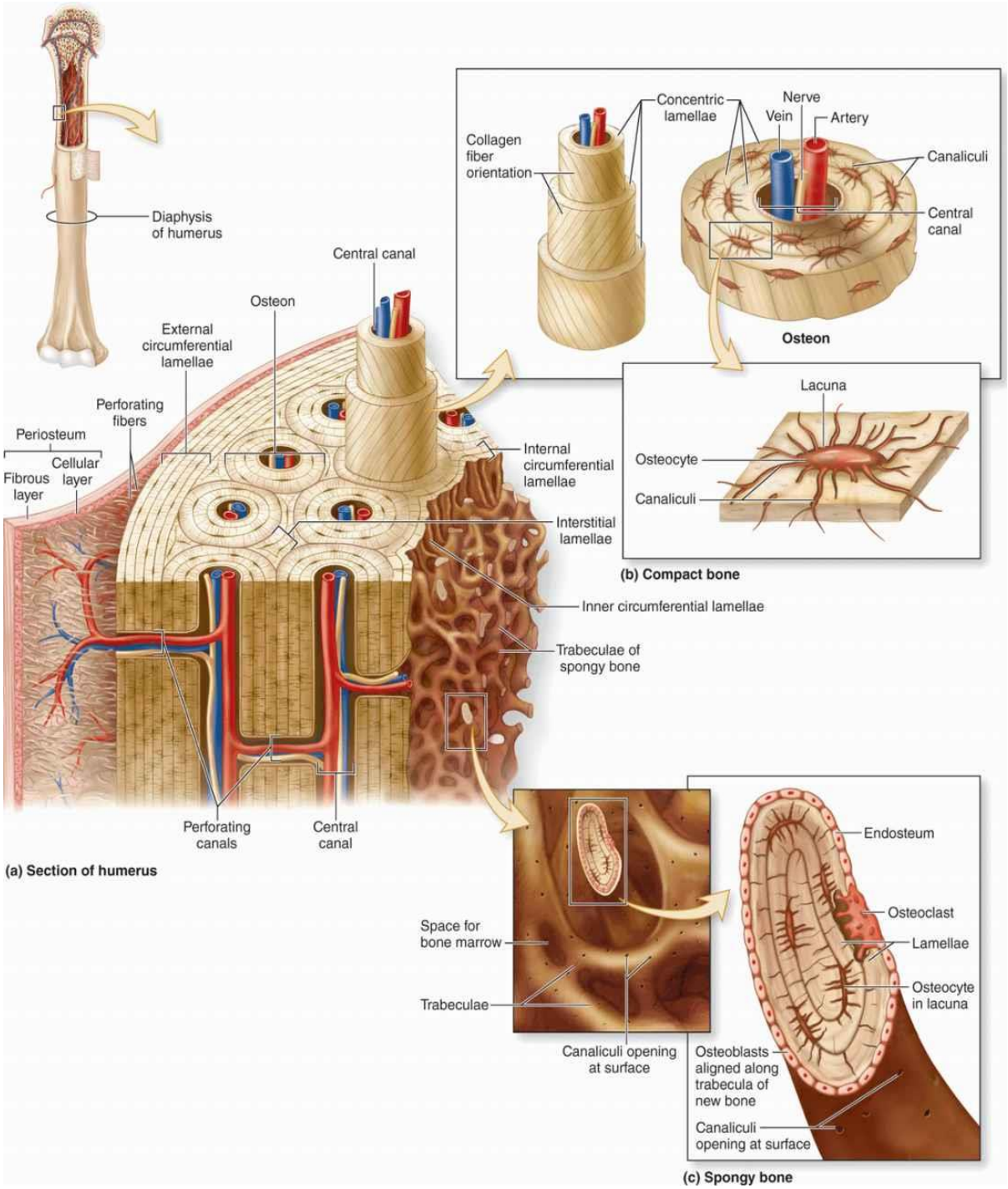


Figure 2 : Anatomie macroscopique et microscopie des différents compartiments d'un os long (humérus humain). Source: Mescher et al., in Junqueira's Basic Histology, 13th Edition, McGraw-Hill Education, 2013.

2. Structure du tissu osseux

Le tissu osseux est caractérisé par sa matrice extracellulaire minéralisée. Les ostéoblastes et les ostéocytes sont des cellules responsables de la formation et du maintien de la matrice osseuse, tandis que les ostéoclastes assurent sa destruction.

a. La matrice osseuse

La matrice extracellulaire du tissu osseux est pauvre en eau mais riche en substances minérales. Il s'agit principalement de complexes cristallins de calcium et de phosphate, sous forme d'hydroxyapatite (HAP). Ceux-ci se forment sur une trame de collagène de type I (Coll I), qui représente 90% de la fraction organique de la matrice osseuse. Le reste de la fraction organique est constitué d'acide hyaluronique et de multiples protéines dites « non-collagéniques » (PNC) appartenant à plusieurs familles : petits protéoglycanes (PGs), Gla-protéines telles que l'ostéocalcine (OCN), protéines SIBLING (voir plus loin), des facteurs de croissance dont 1'Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1), le Transforming Growth Factor-β (TGF-β) et de nombreux autres composants (Licini et al., 2019). La substance minérale confère à l'os sa rigidité et sa résistance aux forces compressives. La composante organique quant à elle donne au tissu osseux ses propriétés d'élasticité et de résistance aux forces de tension. Le bon équilibre entre rigidité et élasticité osseuse est donc dépendant de la proportion de substance minérale et de substance organique, et aussi de leurs qualités respectives (Fonseca et al., 2014).

b. Les cellules osseuses

Les ostéoblastes

Les ostéoblastes proviennent de la différenciation de cellules souches squelettiques (CSS) présentes dans la moelle osseuse et localisées à la périphérie des vaisseaux (Bianco & Robey, 2015; Long, 2012). Le processus de différenciation ostéoblastique est essentiellement sous le contrôle des facteurs de transcription Runt-related transcription factor 2 (Runx2) et en aval de ce dernier Osterix/Sp7 (OSX). La différenciation et l'activité des ostéoblastes sont régulées par de multiples facteurs dont la protéine sclérostine (SCLN) sécrétée par les ostéocytes, qui est un inhibiteur de la formation osseuse en bloquant l'action des cytokines de la famille Wingless (Wnt) sur les ostéoblastes (Baron & Kneissel, 2013).

Lors du processus de formation osseuse, les ostéoblastes déposent une matrice organique osseuse (ostéoïde) en synthétisant des fibres de collagènes associées d'abord à des glycoprotéines matricielles telles que la fibronectine et des fibrillines, puis à un cortège de PNC plus spécialisées (dont des PGs). Ils initient ensuite la minéralisation, processus régulé par l'enzyme phosphatase alcaline (PAL) qui

clive le pyrophosphate, inhibiteur majeur de la nucléation des cristaux d'HAP. Le phosphate et le calcium présent dans le milieu cristallisent sous forme d'HAP pour la minéralisation du tissu. Ce mécanisme se déroule par plusieurs étapes : la nucléation, formation de cristaux primordiaux localisés dans les espaces laissés dans les fibres entre les molécules de collagène de type I, puis la croissance et l'expansion des cristaux entre les fibres. La minéralisation primaire est sous le contrôle de l'activité des cellules osseuses, ostéoblastes et ostéocytes (Atkins & Findlay, 2012) ; la croissance et la maturation ultérieure des cristaux d'HAP, dite minéralisation secondaire, est un processus physico-chimique qui s'étend sur une longue période.

Lorsque la phase de formation osseuse est terminée, la plupart des ostéoblastes s'engagent dans la voie apoptotique. Certains ostéoblastes sont emprisonnés dans la matrice nouvellement formée et deviennent des ostéocytes. D'autres entrent dans un état quiescent et constituent une couche de cellules aplaties à l'interface entre la matrice minéralisée et la moelle osseuse (endoste) ou le tissu conjonctif bordant l'organe osseux (périoste) ; on parle alors de cellules bordantes. En plus de l'activité de formation, les ostéoblastes peuvent impacter l'activité de résorption puisqu'ils produisent les facteurs Receptor Activator of Nuclear factor κB Ligand (RANKL) et ostéoprotégérine (OPG, voir plus loin).

Les ostéocytes

Les ostéocytes constituent le stade terminal de différenciation des ostéoblastes. Lors du processus de minéralisation, les ostéoblastes en voie d'enfouissement dans la matrice ostéoïde (pré-ostéocytes) projettent des prolongements cytoplasmiques afin d'établir des contacts de type « gap » (jonctions intercellulaires perméables aux ions et aux petites molécules) les uns avec les autres, formant ainsi un réseau. La résultante du processus est l'emprisonnement d'ostéocytes dans des lacunes de la matrice minéralisée, qui émettent des prolongements cytoplasmiques, les dendrites, s'acheminant dans des canalicules. On parle alors de réseau ostéocytaire contenu dans un réseau lacuno-canaliculaire (Lacuno-canalicular Network, LCN). Certains ostéocytes proches des surfaces osseuses peuvent émettre des prolongements débouchant sur l'endoste, le périoste ou des espaces conjonctivo-vasculaires intra-corticaux. Les ostéocytes sont considérés comme les méchano-senseurs majeurs du tissu osseux et les chefs d'orchestre du remodelage. Ils sécrètent de multiples facteurs régulant les activités de formation et de résorption, tels que l'oxyde nitrique (NO), le Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF), RANKL, OPG et SCLN (Figure 3).

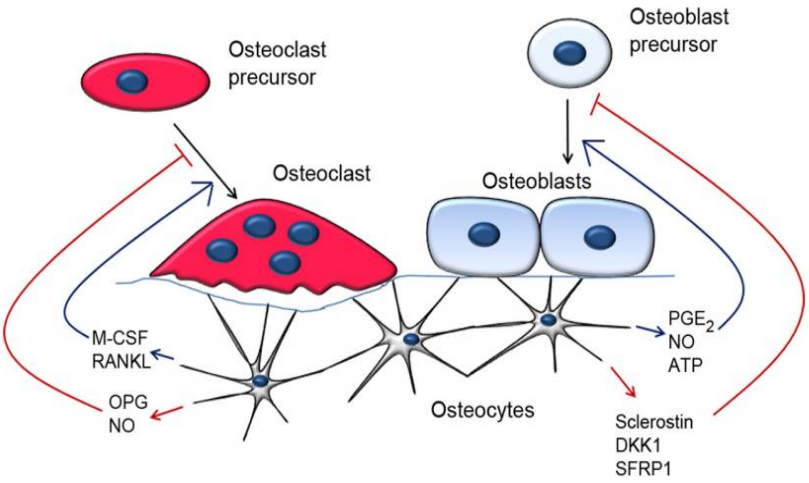


Figure 3 : Régulation des activités ostéoblastiques et ostéoclastiques par les ostéocytes. Dallas S. L., et al., 2021.

Les ostéocytes participent également au maintien de l'équilibre phospho-calcique de l'organisme, par la sécrétion du Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) qui est une hormone agissant, entre autres, sur le rein pour diminuer la réabsorption de phosphate et sur la glande parathyroïde pour limiter la sécrétion de l'hormone parathyroïdienne (PTH). Cette dernière augmente l'absorption intestinale du calcium et du phosphate ainsi que la réabsorption rénale du calcium et diminue la réabsorption du phosphate (Bergwitz & Jüppner, 2010). L'implication de FGF23 dans le métabolisme phosphocalcique souligne ainsi un rôle endocrinien majeur de l'os.

Les ostéoclastes

Les ostéoclastes proviennent de la différentiation de cellules souches hématopoïétiques (CSH) de la moelle osseuse induite par le M-CSF. Les pré-ostéoclastes fusionnent alors donnant les ostéoclastes qui sont donc des cellules multi-nucléées. La différenciation et l'activité des ostéoclastes est régulée par le facteur RANKL, qui se lie au récepteur membranaire RANK des pré-ostéoclastes, et OPG qui inhibe l'activité de RANKL en le piégeant pour l'empêcher de se lier à son récepteur (Ikeda & Takeshita, 2016). Les ostéoclastes présentent sur leur pôle basal une membrane fortement plissée (« en brosse »), qui augmente la surface d'échange avec la matrice osseuse, et une zone de scellement (« sealing zone ») périphérique, dont la membrane adhère au tissu osseux pour assurer l'étanchéité du compartiment de résorption (Figure 4). Cette adhésion est due au contact entre des intégrines membranaires des ostéoclastes et des protéines matricielles telles que l'ostéopontine (OPN) et la sialoprotéine osseuse (BSP) (Ross et al., 1993). Le processus de résorption se déroule par la libération d'ions H+ pour la dissolution de la substance minérale et d'enzymes protéolytiques, telles que la cathepsine-K et des métalloprotéases pour la digestion de la substance organique. A la fin de la résorption, les ostéoclastes s'engagent dans la voie apoptotique.

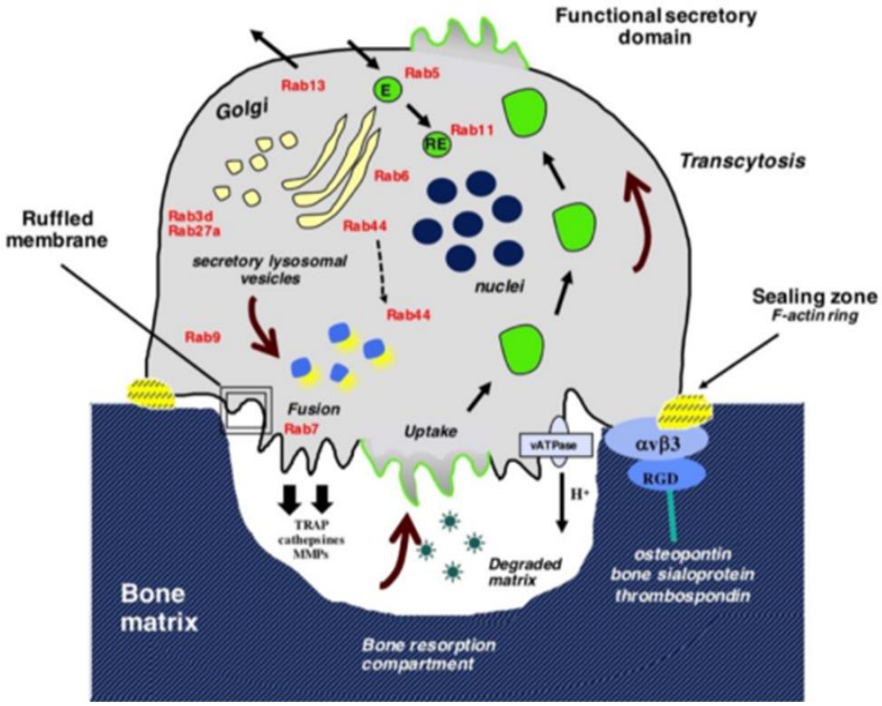


Figure 4 : Processus de digestion de la matrice osseuse par un ostéoclaste. Roy et.al., 2020.

c. Les types de tissus osseux

On distingue deux stades de tissu osseux : primaire et secondaire.

Le tissu osseux primaire ou tissé

L'os tissé est le premier tissu osseux à se former. Il se caractérise par un dépôt non structuré des fibres de collagènes et des minéraux. Il est progressivement remplacé par le tissu osseux secondaire mais peut-être retrouvé dans certaines situations d'ossification rapide (cals de fracture) ou de turnover accéléré de la matrice (certaines pathologies ou tumeurs osseuses).

Le tissu osseux secondaire ou lamellaire

L'os lamellaire est mis en place après remodelage (voir plus bas). Il est caractérisé par l'orientation parallèle des fibres de collagènes et une structuration en lamelles empilées. L'orientation des fibres varie d'une lamelle à l'autre. Les logettes des ostéocytes sont allongées parallèlement au plan des lamelles. Cette organisation confère à ce tissu sa rigidité et sa résistance.

3. Physiologie du tissu osseux

a. Le développement osseux

Le développement du tissu osseux se déroule à travers deux types d'ossification : endochondrale et membranaire.

L'ossification endochondrale

Elle concerne les os dits courts (tels que les vertèbres) et longs, mais aussi les os de la base du crâne. L'ossification endochondrale a pour point de départ la formation d'une ébauche cartilagineuse issue de la condensation de cellules mésenchymateuses. Ces dernières se différencient en chondrocytes principalement sous l'expression du gène SRY-box transcription factor 9 (Sox9). S'ensuivent des phases de maturation et d'hypertrophie sous l'expression de plusieurs gènes dont notamment Runx2. Les chondrocytes hypertrophiques formés vont induire une angiogenèse par sécrétion de Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Il en résulte une invasion vasculaire dans l'ébauche cartilagineuse qui va amener des ostéoclastes pour dégrader la matrice cartilagineuse, suivis par des ostéoblastes pour la remplacer par une matrice osseuse primaire, qui sera secondairement (après remodelage) remplacée par un tissu osseux lamellaire.
L'ossification endochondrale participe de plus à la croissance en longueur des os longs à travers l'ossification des plaques de croissance épiphysaires. Ce processus se déroule par une prolifération chondrocytaire (et donc du cartilage) orientée vers le compartiment métaphysaire. Par la suite, les chondrocytes s'hypertrophient et initient une minéralisation du cartilage. Ce dernier sera résorbé par les ostéoclastes pour être remplacé par du tissu osseux grâce aux ostéoblastes.

L'ossification membranaire

Elle concerne la croissance des os plats tels que la calvaria et une partie de l'omoplate. L'ossification membranaire débute elle aussi par la condensation de cellules mésenchymateuses mais ces dernières vont directement se différencier en ostéoblastes qui déposeront une matrice osseuse.

b. Le modelage osseux

Au cours de sa croissance et pendant toute la vie, les os du squelette peuvent modifier leur forme et leurs proportions. Ce processus apparaît suite aux étapes du développement et se réalise grâce à des activités de formation et/ou de résorption différentielles. Par exemple l'une des faces de la pièce osseuse peut se développer activement par apposition, tandis que l'autre croit plus lentement ou est même le siège d'une résorption. Cette croissance différentielle provoque une modification de la masse, de la forme d'un os, et dans certains cas un glissement de son grand axe. La dynamique ainsi que le

résultat du modelage osseux sont très dépendants des contraintes mécaniques qui sont perçues par l'os. Ces stimuli sont liés au poids de l'individu et à son mode de vie (sédentaire ou actif).

Chaque compartiment osseux possède sa propre configuration de modelage. Ainsi durant la croissance des os longs par ossification endochondrale, le modelage aura pour but de garder la forme de l'os notamment au niveau des régions métaphysaires. Pendant que l'os croit en longueur, une résorption a lieu sur la surface périostée alors que la formation se déroule sur la surface endostée (Figure 5). Ceci permet de garder des proportions similaires entre la largeur métaphysaire et la largeur diaphysaire.

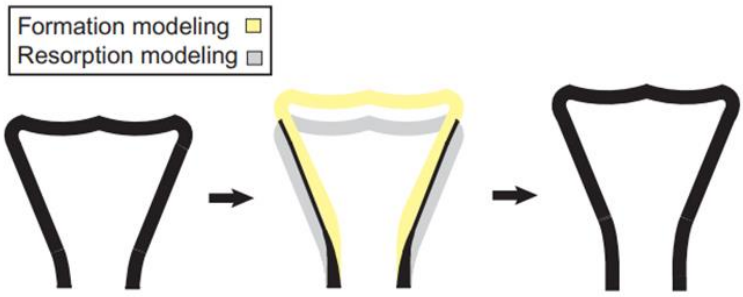


Figure 5 : Illustration du modelage de l'extrémité d'un os long durant la croissance en longueur. Allen et al., 2014.

A l'inverse, dans certains compartiments diaphysaires, la croissance radiale (en largeur) implique une résorption sur la surface endostée concomitante d'une formation périostée. Ce processus amène à l'épaississement de la diaphyse (activité de formation plus importante que l'activité de résorption), tout en élargissant l'os (Figure 6).

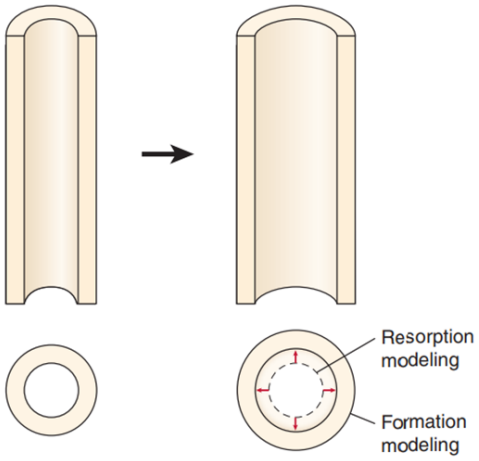


Figure 6 : Illustration du modelage d'un fragment diaphysaire en croissance radiale. Allen et al., 2014.

Un autre aspect du modelage est le « drift » (« dérive ») qui vise à déplacer le grand axe d'un compartiment osseux. Ce processus a lieu grâce à une coordination d'activités de formation et de résorption sur des surfaces osseuses distinctes. Dans un compartiment diaphysaire soumis à un drift, l'os cortical sera compartimenté en secteurs qui auront soit une formation sur les deux surfaces, soit une formation endostée avec une résorption périostée, soit l'inverse (Figure 7).

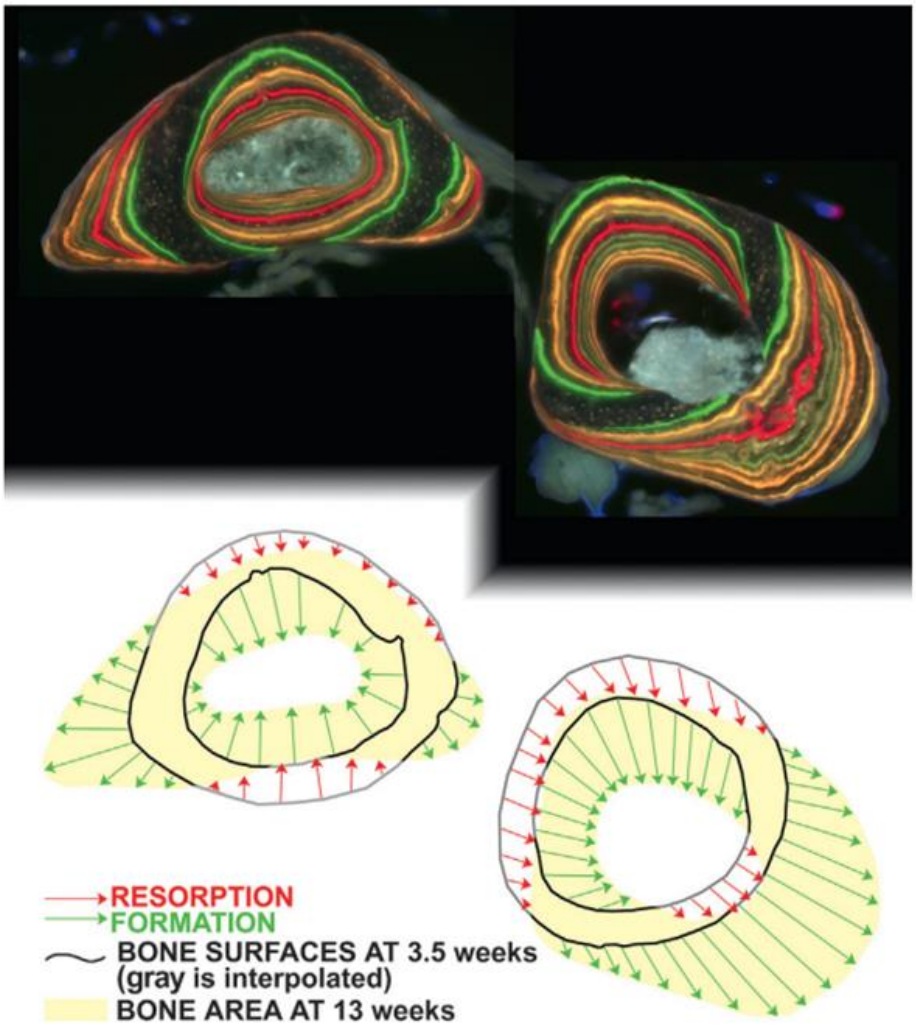


Figure 7 : Image et illustration du « drift » osseux d'un cubitus (à gauche) et d'un radius (à droite) de souris. Différents fluorochromes ont été injectés presque toutes les semaines de l'âge de 3 semaines et demie à l'âge de 13 semaines. Allen et al., 2014.

La dynamique du drift est dépendante des caractéristiques architecturales initiales de la pièce osseuse (position, épaisseur, courbure) ainsi que des contraintes mécaniques perçues. Il y a donc un point de départ et un point d'arrivée à atteindre. Ce mécanisme vise en premier lieu à trouver une distribution optimale de la masse osseuse afin d'être adaptée aux charges mécaniques qu'elle reçoit.

En biomécanique, des axes virtuels séparant des zones à résorption endostée et formation périostée de celles à résorption périostée et formation endostée sont définis comme des axes de neutralité mécanique (Figure 8).

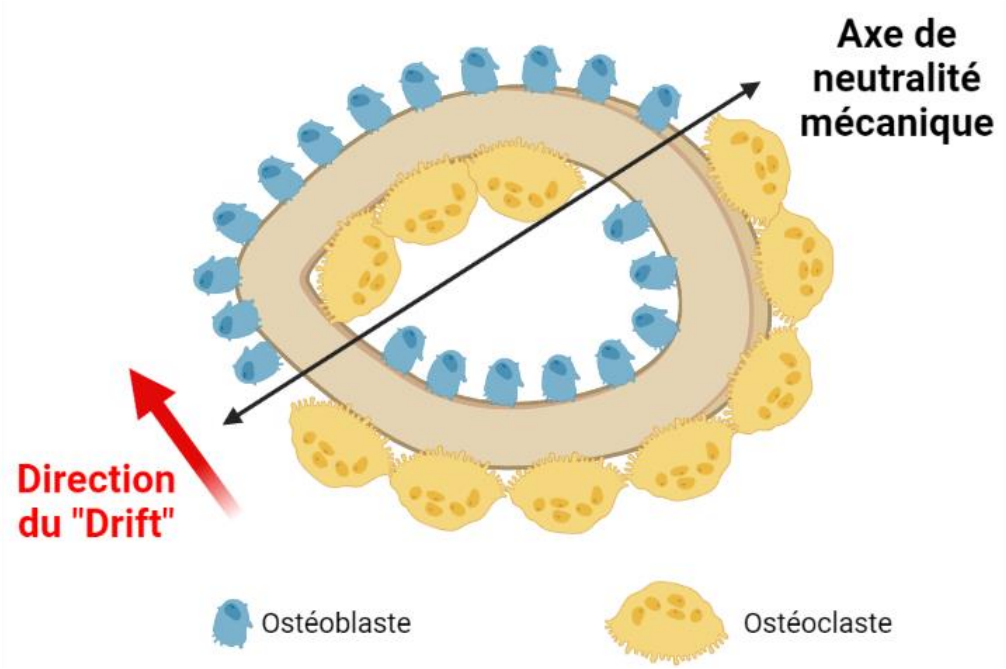


Figure 8 : Illustration d'un os cortical en « drift » avec l'axe de neutralité mécanique.

c. Le remodelage osseux

Le remodelage est un renouvellement du tissu osseux qui s'effectue grâce à une action de résorption par les ostéoclastes suivie d'une formation par les ostéoblastes. Il diffère du modelage en ce que la résorption et la formation sont ici coordonnées (par de multiples facteurs paracrines) et successives sur le même site (Henriksen et al., 2009). Le remodelage est nécessaire pour entretenir la qualité du tissu osseux à travers le remplacement d'un tissu minéralisé ancien ou présentant des micro-fractures, ceci dans un but d'adaptation aux contraintes mécaniques. La modulation du remodelage sert aussi à mobiliser ou au contraire stocker les ions calcium et phosphate, et ainsi réguler l'homéostasie phospho-calcique.

Le remodelage est généralement décrit en 5 phases (Figure 9) :

- La phase d'activation est enclenchée par les ostéocytes suite à un signal mécanique qui peut-être la survenue d'une micro-fracture locale. Les ostéocytes envoient des signaux aux cellules bordantes pour qu'elles se détachent de la surface osseuse afin de former une structure appelée « canopée » au-dessus de la surface de remodelage. Des progéniteurs ostéoclastiques vont être alors recrutés et vont fusionner et se différentier en ostéoclastes (Delaissé et al., 2020).
- La phase de résorption durant laquelle les ostéoclastes dégradent la substance minérale puis la substance organique.

- La phase de réversion durant laquelle des cellules macrophagiques se déposent sur les surfaces résorbées pour éliminer des résidus de matrice et pour préparer l'os au dépôt d'une nouvelle matrice.
- La phase de formation assurée par les ostéoblastes qui vont sécréter le tissu ostéoïde.
- La phase de minéralisation qui correspond à la formation des cristaux d'hydroxyapatite.

Ces évènements sont régulés par des facteurs de croissance locaux influençant l'activité des ostéoblastes tels que les Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), le TGF-β, les Fibroblast Growth Factors (FGF) et l'IGF-1. D'autre part, des facteurs d'origine systémique tels que la PTH et la vitamine D régulent la sécrétion ostéoblastique de RANKL et de M-CSF, influençant à leur tour l'activité de résorption. Les hormones sexuelles, dont les œstrogènes, inhibent l'activité de résorption. De ce fait lors de la ménopause qui se caractérise entre autre par une chute du taux d'œstrogènes, l'activité de résorption devient importante amenant ainsi à une diminution de la masse osseuse.

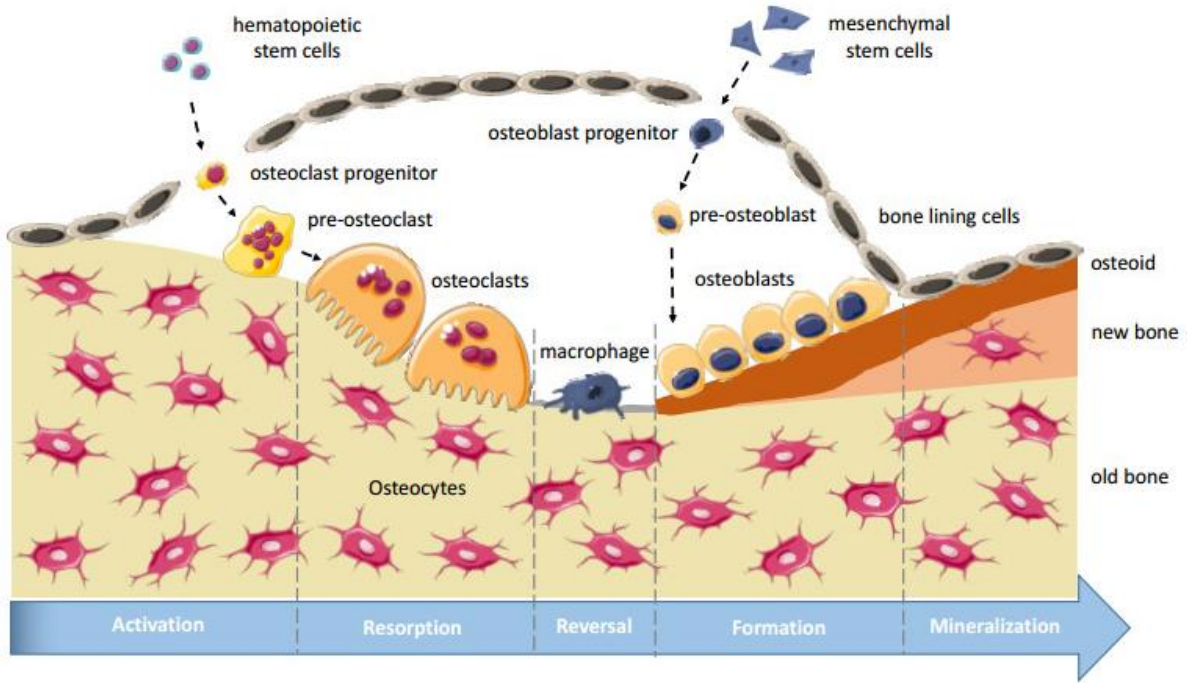


Figure 9 : Illustration des différentes étapes du remodelage osseux. Truesdell et al., 2020.

B. Contraintes mécaniques et os

Le squelette a été décrit depuis le 19ème siècle comme ayant la capacité de s'adapter aux contraintes mécaniques. Les premières observations ont été réalisées sur l'os trabéculaire de fémurs humains où les travées osseuses étaient décrites comme étant orientées dans des directions préférentielles pour s'adapter aux contraintes mécaniques. Les premières hypothèses de l'époque ont été exposées dans le traité « On the Inner Architecture of Bones and its Importance for Bone

Growth » de l'orthopédiste Julius Wolff publié en 1870, et ont constitué les prémices des travaux sur l'os et son adaptation aux contraintes mécaniques (Figure 10).

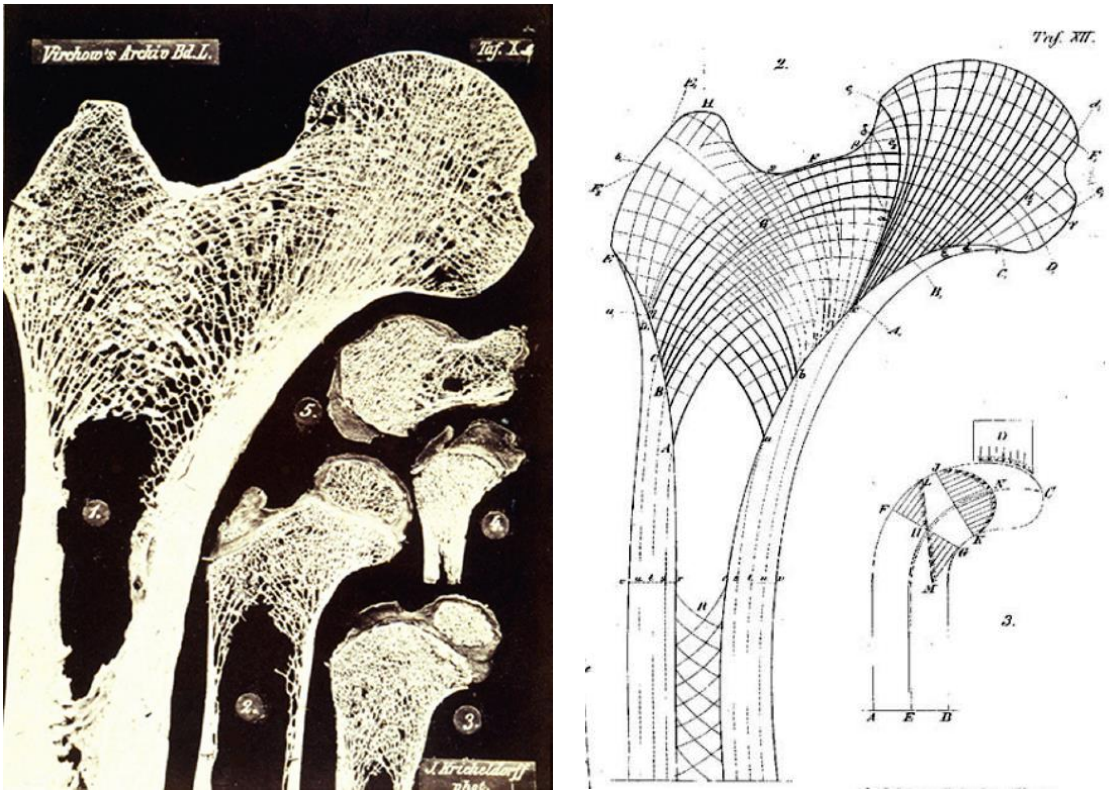


Figure 10 : Organisation de l'os trabéculaire dans plusieurs pièces osseuses humaines d'individus d'âges différents (à gauche) et représentation des forces et des trajectoires à l'intérieur de l'os trabéculaire (à droite). Images reproduites depuis Wolff J., Virchow's Arch Pathol. Anat. Physiol. 1870; 50:389–450, ré-imprimées dans Clin. Orthop. Rel. Res. 2010; 468:1056–1065.

1. Adaptation de l'os aux contraintes mécaniques

Dans la physiologie terrestre, la première source de contrainte que subit l'os est le poids de l'individu lui-même qui est généré par la force gravitationnelle. Cette dernière permet donc de maintenir une charge mécanique sur l'os, qui va l'obliger à maintenir une structure résistante (Iwaniec & Turner, 2016). Dans des conditions de décharge comme pendant les vols spatiaux qui exposent le corps à la microgravité, l'absence de contraintes provoque la perte osseuse (Vico & Hargens, 2018). Ces effets peuvent aussi être retrouvés chez les personnes à mode de vie sédentaire ou en alitement.

En plus de l'effet de la gravité terrestre, une multitude de contraintes mécaniques vont se rajouter et impacter le tissu osseux de différentes manières comme lors de la marche ou la pratique d'une activité sportive. Le stress mécanique appliqué sur l'os est exprimé en Newton par mètre carré (N/m^2) ou en Pascals (Pa). La perception de ce stress par l'os est quantifiable par la notion de déformation tissulaire (strain en anglais) symbolisée par epsilon (ε). Cette dernière est calculée en divisant une variation de

longueur (ΔL) par une longueur initiale (L_0). Ainsi $\varepsilon = \Delta L/L_0$ et ε est exprimé sans unité ou en pourcentage (on peut donc le définir comme un pourcentage de changement de dimension). Les valeurs les plus couramment utilisées sont souvent inférieures à 0.005 inch(« pouce »)/inch et sont de ce fait exprimées en μ microstrain ($\mu\varepsilon = \varepsilon * 10^{-6}$). Une approche simple connue sous le nom de « théorie du mécanostat » a été proposée par Harold Frost en 1987 pour mettre en relation la déformation tissulaire en réponse au stimulus et la réponse biologique générée (Figure 11). Selon ce principe, lorsque le tissu osseux ne subit aucune contrainte mécanique, ou des contraintes très faibles, le remodelage va être activé avec une résorption plus importante que la formation, ce qui va induire une perte osseuse (Frost, 1987). Ceci concerne les contraintes induisant des déformations inférieures à 200με (Stanford & Brand, 1999). Pour une sollicitation mécanique comprise entre 200 et 2500με la déformation tissulaire va provoquer un remodelage équilibré qui va maintenir la masse osseuse. Lorsque la charge mécanique provoque une déformation qui dépasse un certain seuil (>2000με), un modelage va se déclencher à travers l'activité de formation et va ainsi augmenter la masse (et la résistance) osseuse pour s'adapter et éviter une fracture. Cependant au-delà d'un certain seuil (>3500 et jusqu'à 25000με), la contrainte mécanique va provoquer la fracture du tissu.

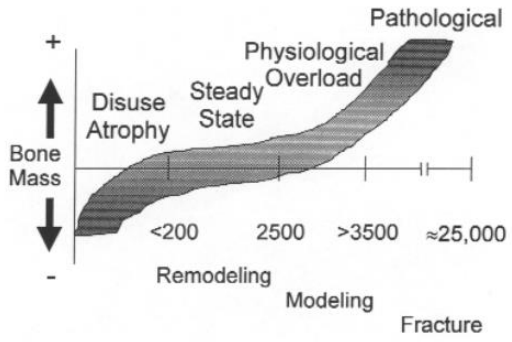


Figure 11: Illustration de la théorie du mécano-stat de Frost. Stanford et al., 1999.

En réalité, l'adaptation du squelette ne suit pas un modèle linéaire car l'ampleur de la déformation n'est pas le seul facteur qui détermine l'adaptation de l'os. Plusieurs autres composantes physiques du stimulus mécanique s'ajoutent à l'amplitude de la contrainte et jouent un rôle fondamental dans la réponse du squelette. Il s'agit entre autre de la fréquence, la durée et la polarité (compression, tension, etc.) de la contrainte qui vont être transmises au corps sous forme de signaux vibratoires (Robling et al., 2019). C'est la combinaison de ces composantes lors d'un stress mécanique qui va provoquer une déformation tissulaire déterminante dans la réponse du squelette et son adaptation (Hart et al., 2017). Par exemple, la fréquence, exprimée en Hertz (Hz), correspond au nombre de cycle de contrainte appliquée pendant une seconde (1Hz = 1 cycle/seconde). Une augmentation de la fréquence d'un stimulus mécanique abaisse le seuil pour lequel l'amplitude de la déformation induit une réponse ostéogénique, et vice-versa. La relation entre l'amplitude de la déformation et la fréquence est illustrée

dans la figure 12 qui schématise les résultats d'une étude sur des contraintes mécaniques ciblées sur le cubitus de dinde en utilisant plusieurs configurations de contrainte-fréquence (Qin et al., 1998).

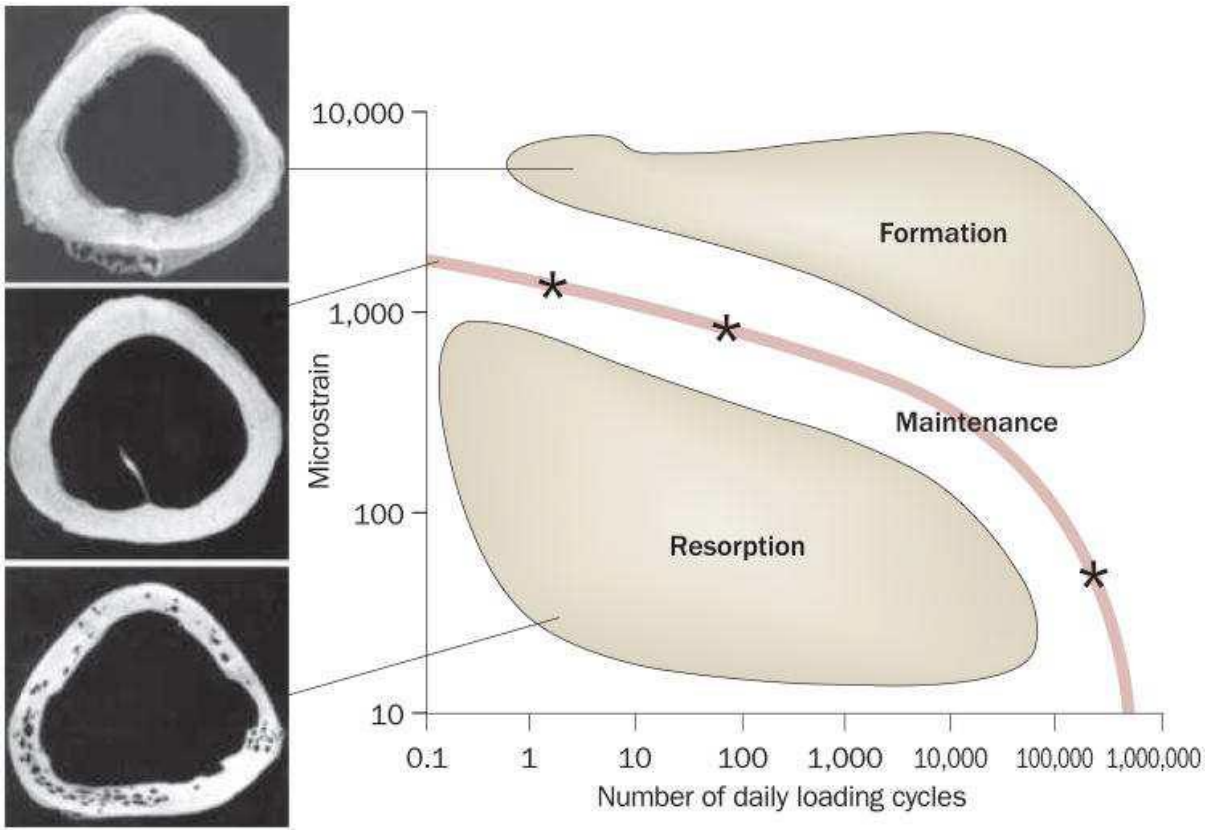


Figure 12 : Relation entre l'amplitude de la déformation, la fréquence et l'adaptation osseuse dans un modèle de contrainte mécanique ciblé sur le cubitus de dinde. Ozcivici et. al., 1998.

2. Contraintes mécaniques appliquées sur modèle animal

Plusieurs modèles de contrainte mécanique ont été développés par les chercheurs d'une part pour voir l'effet d'une combinaison de paramètres physiques externes sur le tissu osseux, mais aussi d'autre part pour déceler l'effet de défaillances biologiques du tissu osseux sur la réponse aux contraintes mécaniques. Ces modèles ont permis d'acquérir une meilleure compréhension de la mécano-biologie osseuse. Les variétés de stimulations mécaniques développées pour les modèles animaux (en majorité pour les souris, les rats et les lapins) peuvent être catégorisées de diverses manières. Dans ce manuscrit elles seront subdivisées en deux parties : les contraintes appliquées sur le corps entier, c'est-à-dire qui visent à agir sur l'ensemble du squelette, et les contraintes limitées à une pièce osseuse spécifique.

Il est à noter que des modèles de décharge mécanique, visant à réduire les contraintes à un minimum sur tout ou partie du squelette, ont été employés pour étudier des situations compromettantes comme l'alitement prolongé ou l'exposition à la microgravité. Ces contextes sont reproduits par exemple par

la suspension par la queue, qui met en décharge les os du train arrière (Amblard et al., 2003; Peres-Ueno et al., 2017), la neurectomie sciatique, qui vise à supprimer toute contrainte musculaire (Zeng et al., 1996) et la microgravité en orbite (Gerbaix et al., 2017). Ces approches expérimentales, complémentaires de celles que nous avons utilisé, ne seront pas détaillées dans ce manuscrit.

a. Modèles de contrainte appliquée sur le corps entier

Plusieurs types de contraintes expérimentales peuvent affecter le corps entier, avec cependant des compartiments osseux préférentiellement sensibles selon les types de stimulus. La réponse du squelette soumis à ce type de contrainte sera systémique, apportant des éléments physiologiques globaux et permettant de voir l'effet sur différentes pièces osseuses situées à des endroits différents du corps. Parmi les modèles en question, le tapis de course, l'hyper-gravité et la vibration du corps entier sont les plus souvent utilisés.

Le tapis de course

Utilisé pour mimer la marche ou la course, le tapis de course (« treadmill » en anglais) est employé surtout chez les souris et les rats. Il consiste à déposer les animaux sur un tapis roulant et de les soumettre à une activité physique de locomotion à une vitesse donnée qui est réglable et adaptable aux animaux. Etant donné que ce type de contrainte requiert un effort physique de l'individu receveur, les études sur modèles murins nécessitent le plus souvent une adaptation préalable du régime aux performances physiques et cardio-respiratoires des animaux utilisés de manière individuelle (Seldeen et al., 2019). Il est ainsi possible d'adapter à la vitesse maximale (Vmax) en réglant la vitesse à un certain pourcentage de celle à laquelle les animaux n'arrivent plus à suivre le rythme du tapis roulant (Latza et al., 2020). Il est aussi possible d'adapter la vitesse de course à un certain pourcentage du volume de consommation maximale d'oxygène (VO_2 max) des animaux (Zhang et al., 2020). Des inclinaisons de quelques degrés du tapis de course sont parfois appliquées pour augmenter la difficulté de l'exercice. Il a été démontré que le treadmill peut augmenter la masse osseuse chez des souris en croissance (8 semaines d'âge) et des souris adultes (36 semaines d'âge) mais que les paramètres biomécaniques ne sont améliorés que chez les souris en croissance (Gardinier et al., 2018). Cependant, chez des souris femelles ovariectomisées, le treadmill appliqué à différentes intensités n'empêche par la perte osseuse (Latza et al., 2020). L'une des limites de ce modèle réside dans le fait que l'effort physique n'est pas volontaire mais forcé. Certaines études utilisent des roues de course dans les cages d'élevage pour que l'activité soit volontaire, ce qui par contre rajoute la complexité de quantifier l'activité de chaque animal et complexifie ainsi la normalisation des résultats obtenus (Majerczak et al., 2020).

L'hypergravité

L'hypergravité (HG) va induire une augmentation du poids apparent de l'individu, et donc de son impact sur le tissu osseux. Ce modèle est étudié pour être utilisé chez les astronautes afin de contrecarrer les effets délétères de la microgravité qu'ils subissent pendant les vols spatiaux (Vico & Hargens, 2018). L'HG est générée par centrifugation. L'application de ces contraintes peut se faire pendant un vol spatial et/ou après le retour sur terre. A ce jour, les études sur les effets de l'HG sur l'humain sont effectuées à court terme et sont appliquées à la suite d'un alitement des individus mais ne montrent pour l'instant par de résultats positifs. Par exemple, l'application quotidienne de 2.5G (= 2.5x la gravité terrestre) pendant une heure n'a pas montré une protection contre la perte osseuse induite par un alitement (Smith et al., 2009). Dans un contexte différent, il a été démontré que l'exposition des pilotes militaire à des taux élevés d'accélération pendant leurs heures de vol augmente la densité minérale osseuse (BMD, pour Bone mineral Density) de manière site-spécifique (Naumann et al., 2001, 2004). Cependant, les effets de l'HG continue sur l'Homme ne sont pas encore connus et ce sont les modèles animaux qui sont utilisés pour essayer d'en élucider les impacts sur l'os et sur d'autres organes et systèmes.

Pour les modèles murins, les animaux sont placés dans de grandes centrifugeuses à nacelles. A l'opposé de la microgravité qui provoque une perte osseuse, il a été démontré sur les souris et les rats que l'HG peut avoir des effets ostéogéniques sur le tissu osseux. Ces impacts sont retrouvés en majeure partie quand l'HG reste au-dessous de 3G, les effets ostéogéniques étant observés à 2G (Argyrou & Lambrou, 2019; Gnyubkin et al., 2015; Tominari et al., 2019). Ces effets sont retrouvés en majorité sur l'os trabéculaire de différentes pièces osseuses telles que l'humérus, le fémur, le tibia et les vertèbres (Figures 13 et 14). De manière intéressante, le gain osseux sous HG a été décrit comme résultant en grande partie d'une chute de l'activité de résorption chez des souris en croissance (Gnyubkin et al., 2015). De même, il a été démontré que chez des rates ovariectomisées l'HG limite la perte osseuse trabéculaire en diminuant l'activité de résorption (Ikawa et al., 2011). Ceci est symétrique des effets de la microgravité qui induit primairement une augmentation de l'activité de résorption, établie dans des modèles *in vitro* (Nabavi et al., 2011; Rucci et al., 2007) et *in vivo* (Blaber et al., 2013; Gerbaix et al., 2017). Il est cependant à noter que les études de l'HG sur modèle animal impliquent une composante de locomotion, et pas seulement une augmentation de l'impact du poids, car les animaux se déplacent dans leurs cages lors de la centrifugation (Tominari et al., 2019). Ceci implique donc des impacts sur les os des membres que vont recevoir les animaux et qui vont être transmis au reste du squelette sous forme de vibrations. Les diverses études montrent que pendant les premiers jours sous HG les animaux se déplacent très peu à cause de la perturbation brutale du système vestibulaire, mais que leur activité reprend au fil du temps, signe d'une adaptation au nouvel environnement (Shimomura et al., 2021).

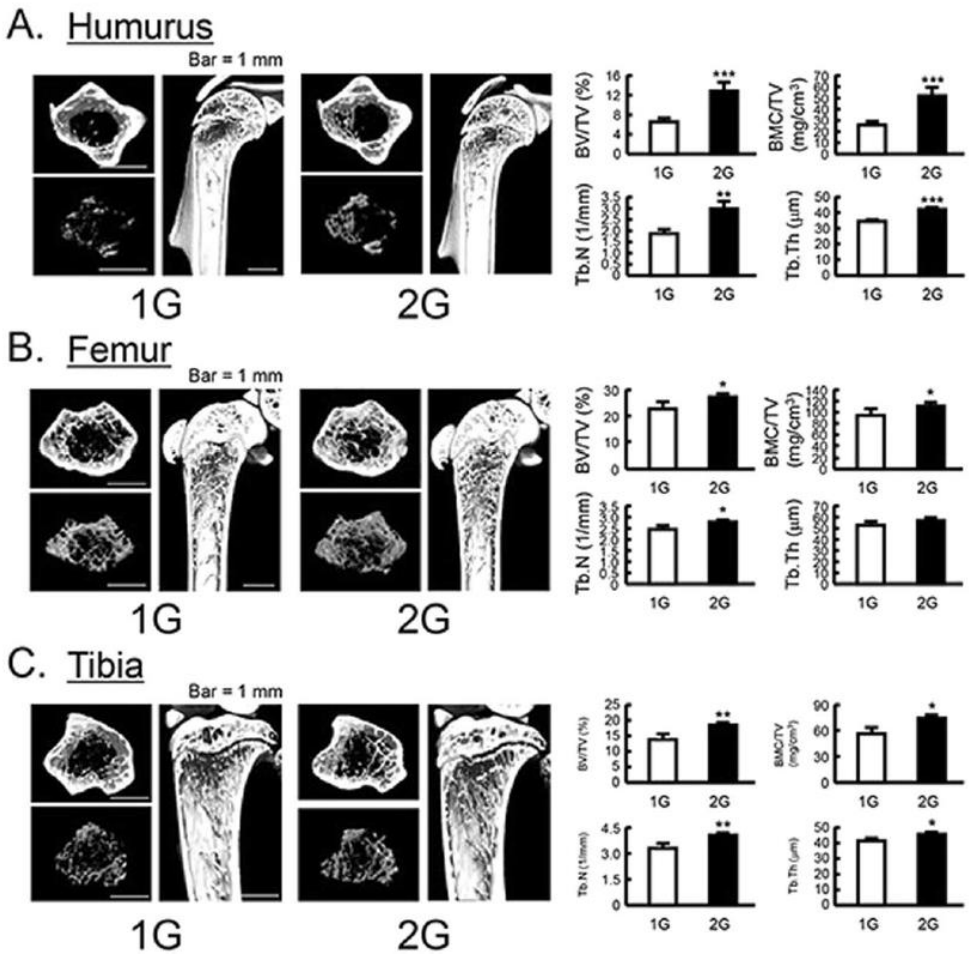


Figure 13 : Effet de 2 semaines d'hyper-gravité à 2G sur les paramètres architecturaux du réseau trabéculaire métaphysaire de l'humérus proximal (A), du fémur distal (B) et du tibia proximal (C) chez des souris mâles. Tominari et al., 2019.

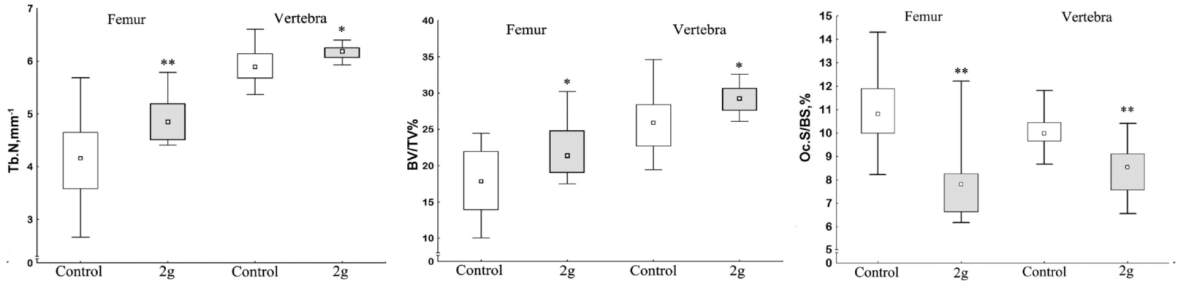


Figure 14 : Effet de 3 semaines d'hypergravité à 2G sur le nombre de trabécules (Tb.N), la fraction volumique (BV/TV) et les surfaces ostéoclastiques (Oc.S/BS) de l'os trabéculaire du fémur distal et de la vertèbre L2 chez des souris mâles. Gnyubkin et al., 2015.

D'autres études se sont penchées sur l'effet de l'HG sur d'autres organes et systèmes tels que les muscles, le microbiote intestinal, le système vestibulaire et la barrière hémato-encéphalique (Alauzet et al., 2019; Dubayle et al., 2020; Kawao et al., 2016). Tous ces composants exposés à l'HG peuvent à leur tour impacter l'os étant donné qu'il s'agit d'un modèle systémique. Il a par exemple été démontré que les effets ostéogéniques de l'HG sur la souris peuvent être limités par une lésion du système vestibulaire induite par chirurgie, précisément par ablation de la membrane tympanique, du marteau, de l'enclume et de l'étrier suivie par une aspiration du liquide labyrinthique (Kawao et al., 2018).

La vibration du corps entier

Les contraintes mécaniques induites par une activité physique telle que la marche ou la course sont transmises au corps à travers des signaux vibratoires. Pour mimer ces stimuli chez des personnes ayant des pathologies osseuses, ou des incapacités à réaliser une activité physique ou chez les femmes ménopausées, la vibration corps entier, ou « whole body vibration » (WBV), a été proposée et a fait l'objet de plusieurs études chez l'Homme et dans des modèles animaux. La WBV consiste à appliquer un mouvement oscillatoire sur le corps qui va être dépendant de plusieurs paramètres dont les principaux sont l'accélération (G) et la fréquence (Hz). Les études sur modèle murin de ce régime ont comme principal objectif de déterminer des paramètres à effet ostéogénique pour des situations physiologiques ou pathologiques différentes. Il s'agit par exemple d'appliquer les vibrations sur un modèle murin en croissance (Christiansen & Silva, 2006; Gnyubkin et al., 2016; Minematsu et al., 2019b; Wehrle et al., 2014), durant le vieillissement (Minematsu et al., 2019a; Wenger et al., 2010) ou après ovariectomie en combinant ou non avec un modèle de réparation de fracture (Butezloff et al., 2015; Chow et al., 2016; Gao et al., 2016; Wehrle et al., 2015). Une grande variabilité des résultats a été soulignée par différentes revues sur le sujet (Prisby et al., 2008; Reynolds et al., 2018). Celles-ci mettent en cause les variations de plusieurs paramètres intrinsèques à la vibration (telles que l'amplitude, la fréquence, la durée des séances de vibration, la répétition, etc.) et aux individus utilisés (modèle animal, âge, sexe, situation physiologique ou pathologique).

La marche est considérée comme induisant des impacts moyens avec une fréquence de 1Hz et participe au maintien du capital osseux. Un exercice comme le saut vertical présente quant à lui des impacts forts mais à fréquence basse. En se basant sur la relation entre l'impact de la contrainte et la fréquence, la vibration a été largement testée à faible impact mais à de hautes fréquences (Figure 15).

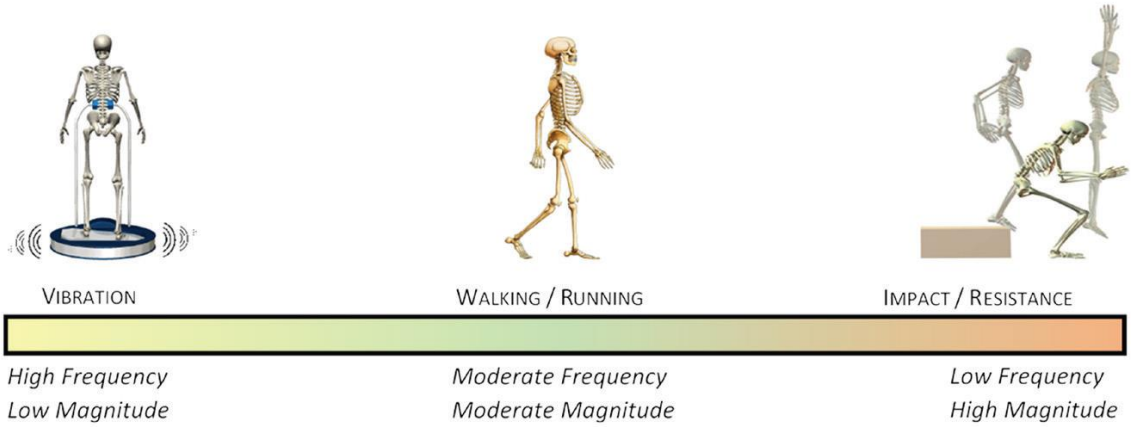


Figure 15 : Effets ostéogéniques théoriques des configurations faible amplitude/haute fréquence, moyenne amplitude/moyenne fréquence et forte amplitude/faible fréquence. Hart et. al., 2017.

La majorité des études ont testé des régimes à moins de 1G d'accélération et à des fréquences très variables. Dans une étude sur modèle de rats âgés de 4 semaines, les chercheurs ont fixé l'accélération à 0.5G et la fréquence a été testée à 15, 30, 45, 60 et 90 Hz (Minematsu et al., 2019b). Les résultats ont montré une augmentation de l'épaisseur des trabécules à 45 et 60Hz. La même équipe a publié la même année le même protocole mais appliqué sur des rats âgés de 24 semaines (Minematsu et al., 2019a). Cette fois-ci une augmentation de l'épaisseur des travées a été observée à 15Hz uniquement. Ceci souligne l'effet de l'âge sur la réponse du squelette à un même stimulus mécanique.

Dans une étude de notre laboratoire sur modèle de rat âgé de 45 semaines, la vibration a été appliquée en fixant l'accélération à 0.7G et en l'associant à différentes fréquences : 8 Hz, 52 Hz et 90 Hz (Pasqualini et al., 2013). De manière intéressante, c'est à la fréquence maximale (90 Hz) que les effets ostéogéniques ont été le plus observés, notamment une augmentation de l'épaisseur et de l'aire corticale fémorale (Figure 16). Une autre étude sur modèle de souris en croissance a utilisé la même fréquence de 90 Hz mais en appliquant une accélération de 2G pendant 3 ou 9 semaines, simulant ainsi une hyper-gravité intermittente (Gnyubkin et al., 2016). Sous ce régime, l'os trabéculaire n'a pas subi de modification de la masse osseuse globale (contrairement à ce qui est observé sous HG à 2G comme décrit précédemment) mais a cependant montré une augmentation du remodelage global. L'os cortical quant à lui a montré une augmentation de son épaisseur après 3 semaines de vibration mais plus aucune différence entre les souris vibrées et les souris contrôles n'était percevable après 9 semaines, soulignant un effet de stimulation du rythme de croissance en épaisseur des os (Figure 17).

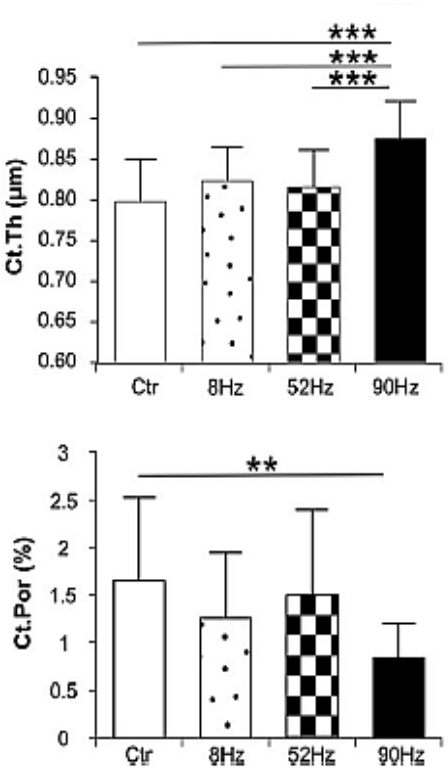


Figure 16 : Effet de la vibration corps entier à 0.7G et à 8, 52 et 90Hz pendant 10 minutes par jour, 5 jours par semaine durant 4 semaines sur l'épaisseur (figure de haut) et la porosité (figure de bas) de l'os cortical du fémur de rat. Pasqualini et. al., 2013.

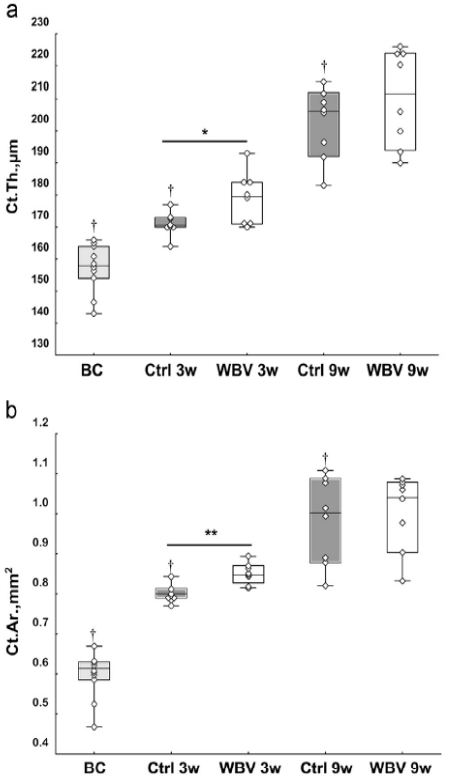


Figure 17 : Effet de la vibration corps entier à 2G et 90Hz pendant 15 minutes par jour, 5 jours par semaine durant 3 ou 9 semaines sur l'épaisseur (a) et l'aire (b) de l'os cortical de fémur de souris. Gnyubkin et. al., 2016.

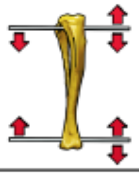
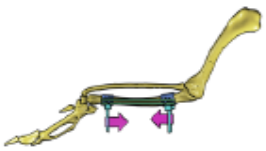
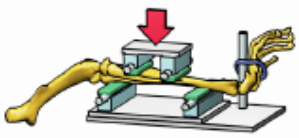
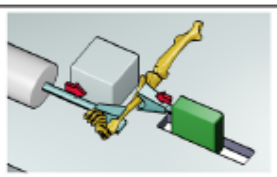
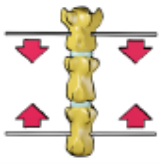
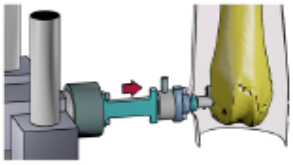
b. <u>Modèles de contrainte appliquée sur une pièce osseuse spécifique</u>

Cette seconde catégorie de modèle de contrainte se caractérise par une augmentation de la précision du signal mécanique souhaité en adaptant la contrainte aux propriétés biomécaniques de la pièce osseuse cible (Main et al., 2020). La réponse systémique du corps, et plus particulièrement celle du squelette, n'est cependant pas prise en compte. En effet, certains auteurs considèrent que l'effet de ce type de contrainte est strictement local ce qui permet de prendre la pièce osseuse contro-latérale comme contrôle négatif (par exemple le tibia droit est sous contrainte mécanique et le tibia gauche est son contrôle). Dans cette approche, une étude chez la souris a montré qu'une stimulation mécanique locale n'affecte ni l'architecture ni la dynamique cellulaire des pièces osseuses contro-latérales ou distantes (Sugiyama et al., 2010). Cependant, deux études sur la contrainte mécanique sur le cubitus de jeunes rats ont montré un effet sur le cubitus contro-latéral ainsi que sur d'autres pièces osseuses, remettant en question l'absence de réponse systémique (Sample et al., 2008, 2010). Ce type de modèle ne permet de toute façon pas d'étudier l'effet d'une contrainte sur plusieurs pièces osseuses en même temps et de manière équitable étant donné la délimitation de la zone recevant la contrainte mécanique. De plus,

l'utilisation d'une pièce osseuse contro-latérale en tant que contrôle ne suffit pas toujours pour limiter le nombre total d'animaux comme le suggère certains auteurs (Main et al., 2020). En effet, les analyses histomorphométriques et moléculaires ne peuvent être faites sur un même animal du fait qu'elles doivent être réalisées sur la même pièce du squelette, ce qui en conséquence ne permet pas de réduire le nombre d'animaux. Les principaux modèles de contraintes mécaniques appliqués sur pièce osseuse spécifique sont résumés dans le tableau 1.

L'un des modèles les plus utilisés est la compression axiale tibiale (ligne F du tableau 1). Il possède comme avantage d'impacter l'os trabéculaire et cortical en même temps, contrairement à d'autres modèles qui ne ciblent qu'un seul compartiment. Ce type de contrainte est réalisé en fixant le fémur et le pied du rongeur et en appliquant des compressions sur toute la longueur du tibia. Ce modèle utilise la courbure naturelle du tibia à proximité de la jonction tibio-fibulaire pour induire des contraintes de traction sur la surface antéro-médiale et des contraintes de compression sur la surface postéro-latérale de la diaphyse. La compression axiale tibiale est réalisée en adaptant préalablement la contrainte (et donc la déformation tissulaire) aux propriétés bio-mécaniques des tibias des animaux en question (Melville et al., 2015). La relation contrainte-déformation est déterminée par calibration, en attachant une jauge de contrainte sur le tibia, le plus généralement sur sa surface médiale (figure 18). Lorsque la contrainte par compression axiale est démarrée, la jauge indique la déformation perçue. Généralement, les contraintes utilisées pour induire une réponse sont comprises entre 1200 et 2000με (Main et al., 2020). Différentes localisations d'emplacement de la jauge de contrainte sont utilisées, le plus communément à 37% ou à 50% de la longueur.

Tableau 1: Modèles de contraintes mécaniques localisées. (A) Contrainte axiale sur tibia via des câbles placés chirurgicalement. (B) Contrainte sur le cubitus de volailles isolé chirurgicalement. (C) Flexion sur 4 points sur tibia de rongeurs. (D) Flexion sur tibia suspendu de souris. (E) Compression axiale sur cubitus de rongeur. (F) Compression axiale sur tibia de rongeur. (G) Compression vertébrale de rongeur. (H) compression sur le trabéculaire distal de fémur de lapin. D'après Main et. al., 2020.

		Species	Tissue compartment	Key parameters
A		• Rabbit[12] • Sheep[43] • Dog[11]	• Cortical	• Strain rate[44] • Load magnitude[45]
B		• Turkey[46] • Chicken[47]	• Cortical	• Dynamic vs static loads[48] • Strain magnitude[49]
C		• Rat[50] • Mouse[51]	• Cortical	• Strain magnitude[52] • Rest insertion[53] • #of loading cycles per session[50]
D		• Mouse[54]	• Cortical	• Rest insertion[55]
E		• Rat[56] • Mouse[57] • Rabbit[58]	• Cortical	• Strain rate[59] • # of cycles per session[60] • # of load sessions[60] • Recovery time between sessions[61] • Strain magnitude[62] • Dynamic vs. static loading[62]
F		• Mouse[63] • Rat[64; 65]	• Cortical • Cancellous	• Strain magnitude[66; 67] • # of cycles per session[66; 68] • Rest insertion[68] • # of sessions/wk[66] • # of wks[66]
G		• Rat[69] • Mouse[70]	• Cancellous	• Load magnitude[70; 71] • # of wks[71]
H		• Rabbit[72]	• Cancellous	• #of loading cycles per session[73] • #of loading sessions[73] • Load magnitude[74]

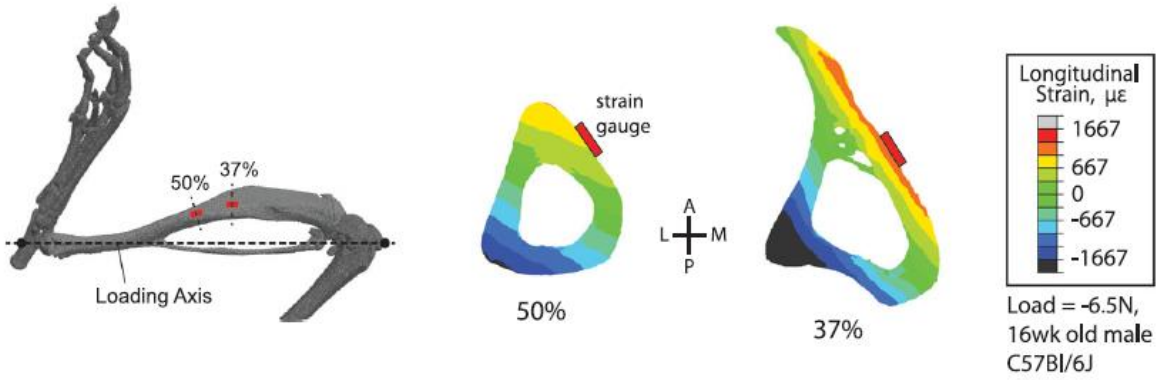


Figure 18 : Placement des jauges de contraintes pour la calibration de la compression axiale du tibia. Main et. al., 2020.

3. Transduction du signal mécanique : rôle des ostéocytes

Les différents types de contraintes décrits précédemment visent un objectif commun : comprendre le fonctionnement ou le dysfonctionnement du tissu osseux face aux stimuli mécaniques. L'un des éléments clés faisant l'objet de plusieurs études est de mettre en évidence la manière dont le tissu osseux perçoit la contrainte et réagit (ou non) en activant et/ou inhibant les activités de formation et/ou de résorption, induisant (ou non) des modifications architecturales globales ou locales. Plusieurs études ont convergé ces dernières années pour considérer que les ostéocytes constituent le mécano-senseur principal du tissu osseux vis-à-vis des contraintes mécaniques (Bonewald, 2011; Dallas et al., 2013; Robling & Bonewald, 2020).

Les ostéocytes constituent 90 à 95% des cellules osseuses dans le squelette d'un Homme adulte (Bonewald, 2011), atteignant 10 fois le nombre d'ostéoblastes (Manolagas, 2000). La densité ostéocytaire est de ce fait très élevée, se situant dans une fourchette comprise entre 19000 et 28500 cellules par mm^3 dans le squelette humain. Un ostéocyte possède en moyenne 90 dendrites (Buenzli & Sims, 2015) qui vont se connecter avec les ostéocytes voisins via des jonctions de types gap, formant ainsi un vaste réseau au sein de la matrice osseuse. Les ostéocytes sont contenus dans des logettes appelées ostéoplastes, ou plus communément appelées lacunes. Les dendrites sont contenues dans des canalicules. L'ensemble du contenant constitue le réseau lacuno-canaliculaire qui correspond à l'interface entre le réseau ostéo-dendritique et la matrice osseuse minéralisée. Le réseau présente de même des ouvertures sur les surfaces endostées et périostées pour être en contact avec les vaisseaux et la moelle osseuse, permettant ainsi des contacts rapprochés avec les ostéoblastes et les ostéclastes ainsi que leurs progéniteurs respectifs.

a. Perception du signal mécanique par les ostéocytes

Une étude a montré que des souris transgéniques exprimant le récepteur à la toxine diphtérique dans les ostéocytes (sous contrôle du promoteur de la DMP1, voir plus loin) et ayant subi une ablation spécifique des ostéocytes par injection de la toxine, présentent une résistance à la perte osseuse induite par décharge mécanique (Tatsumi et al., 2007). Ceci suggère un rôle des ostéocytes dans la perception et la réponse aux stimuli mécaniques.

Les ostéocytes sont soumises à différentes contraintes dans leur environnement telles que des déformations, des forces de cisaillement (« shear stress » en anglais) et des pressions osmotiques différentielles qui induisent des changements de l'état de tension membranaire (Thompson et al., 2011, 2012). Il apparaît que le shear stress constitue la principale contrainte perçue par les ostéocytes et serait induit par le mouvement de flux du liquide interstitiel contenu dans le réseau lacuno-canaliculaire, entre les ostéocytes et la paroi du réseau (Jacobs et al., 2010; Rochefort et al., 2010). L'origine de ces mouvements de fluide n'est pas complètement établie. La principale hypothèse postule qu'une contrainte mécanique modifie la pression extravasculaire, et donc le flux du liquide du LCN (Cowin et al., 1991; Weinbaum et al., 1994). Certains auteurs suggèrent un rôle de la contraction musculaire dans la modification du flux au sein du LCN (Knothe Tate et al., 1998).

Face à ces forces de cisaillement, plusieurs composants ostéocytaires ont été proposés comme jouant un rôle dans la perception du signal mécanique et sont représentés dans la figure 19. Il s'agit notamment du cytosquelette, des cils primaires, des intégrines, des connexines, des canaux ioniques et du glycocalyx (Qin et al., 2020).

Le cytosquelette

Toutes les cellules possèdent un cytosquelette, c'est-à-dire un réseau filamenteux composé d'un ensemble de protéines cytoplasmiques auxquels sont associés d'autres protéines. Le cytosquelette confère aux cellules une forme mais aussi des propriétés mécaniques majeures (Pegoraro et al., 2017). Chez les ostéocytes, les filaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires sont présentes dans le corps cellulaire alors que seuls les filaments d'actines sont présents dans les dendrites (Tanaka-Kamioka et al., 1998). Les études sur le rôle du cytosquelette dans la perception des contraintes restent peu nombreuses. Cependant, une étude a montré que les microtubules sont impliqués dans le flux calciques et l'expression de SLCN sous shear stress sur des cellules de la lignée Ocy454, qui sont un modèle *in vitro* d'ostéocytes (Lyons et al., 2017).

Les cils primaires

Ce sont des extensions cytoplasmiques maintenues sur leur partie intracellulaire par un assemblage de microtubules et qui possèdent une fonction sensorielle pour la cellule (Venkatesh, 2017). Une étude *in*

vitro a montré que la perturbation de la structure des cils primaires chez des lignées cellulaires MC3-T3-E1 (lignée pré-ostéoblastique) et MLO-Y4 (lignée ostéocytaire) réduit la réponse cellulaire au flux en baissant l'expression d'OPN et la quantité de prostaglandine 2 (PGE_2) extracellulaire (Malone et al., 2007). Des modèles *in vivo* de délétion génique de certains constituants des cils primaires ont montré une réduction de la réponse ostéogénique à la suite d'une charge mécanique appliquée sur le cubitus de souris (Lee et al., 2014; Temiyasathit et al., 2012).

Les intégrines

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires formés d'une sous-unité α responsable de la spécificité à un ligand extracellulaire et d'une sous-unité β qui contribue à la transduction du signal intracellulaire (Barczyk et al., 2009). Dans l'os, plusieurs types de chaine α existent dont l'αv. L'intégrine β est quant à elle retrouvée sous la forme β1 dans le corps cellulaire des ostéocytes et β3 dans les dendrites (McNamara et al., 2009). Il a été démontré que des cellules MLO-Y4 exprimant une isoforme β1 tronquée présentent une réduction de la production de Cox-2 et de PGE_2 en réponse à un débit de fluide sans affecter les flux calciques intracellulaires (Litzenberger et al., 2009). De manière intéressante, un antagoniste aux intégrines αvβ3 induit une chute de l'amplitude et du pourcentage de mobilisation de Ca^{2+} en réponse au même type de stimulus (Thi et al., 2013). Une étude *in vivo* a montré que l'extinction génique conditionnelle de l'intégrine β1 dans les ostéoblastes (Cola1(I)-Cre ; Integrin $\beta^{fl/fl}$) diminue le taux de formation dans le cubitus de souris soumise à une contrainte axiale (Litzenberger et al., 2009).

Les connexines

Les connexines sont les constituants de base des jonctions de type gap et des hémi-canaux intercellulaires qui permettent un contact et un échange entre les cellules (Buo & Stains, 2014). La connexine la plus répandue dans le réseau ostéocytaire et qui constitue l'élément principal des communications entre les ostéocytes par les processus dendritiques est la connexine 43 (Cx43). L'extinction génique conditionnelle de cette connexine dans les ostéoblastes de souris (Cola1(I)-Cre ; $Cx43^{-/fl}$) réduit la stimulation de l'activité de formation sous contrainte mécanique appliquée sur l'os tibial (Grimston et al., 2008). D'autre part, l'extinction conditionnelle de la Cx43 dans les ostéoblastes et les ostéocytes (Oc-Cre ; $Cx43^{fl/fl}$) réduit la perte osseuse induite par la suspension par la queue (Lloyd et al., 2012).

Les canaux ioniques

Durant la mécano-transduction cellulaire, la concentration calcique intracellulaire est rapidement augmentée à travers une entrée du calcium extracellulaire (Jing et al., 2014). Plusieurs canaux calciques ont été décrits comme étant réactifs aux stimulations mécaniques et induisant une entrée de

calcium à l'intérieur de la cellule (Yu et al., 2018). Parmi ces canaux, Piezo1 est un canal calcique situé au niveau des ostéocytes et activable mécaniquement (Li et al., 2019, p. 1; Sun et al., 2019). La délétion de ce canal chez des souris a montré une résistance à la perte osseuse induite par suspension par la queue (Wang et al., 2020).

Le glycocalyx

Le glycocalyx est un composant de la matrice extracellulaire constitué de protéoglycanes, de glycoprotéines et d'acide hyaluronique qui sert d'interface entre les ostéocytes et les parois du réseau lacuno-canaliculaire et leur permet de capter les signaux mécaniques (Burra et al., 2011). Cette dernière fonction semble surtout être assurée par le Perlecan, un protéoglycane à héparane sulfate (Wang, 2018). La compression axiale de tibia de souris déficiente en Perlecan n'a pas reproduit l'effet anabolique observé chez les souris sauvages (Wang et al., 2014). Des mesures de flux calciques *ex vivo* sur les tibias de souris déficientes en Perlecan ont montré une réduction de plusieurs paramètres dont l'amplitude des pics calciques et la vitesse de retour aux valeurs basales (Pei et al., 2020).
Les ostéocytes peuvent cependant être en contact direct avec la matrice minéralisée par des structures appelées « collagen hillocks » (ou collines de collagènes) qui sont des projections émanant de la matrice minéralisée vers les dendrites ostéocytaire.

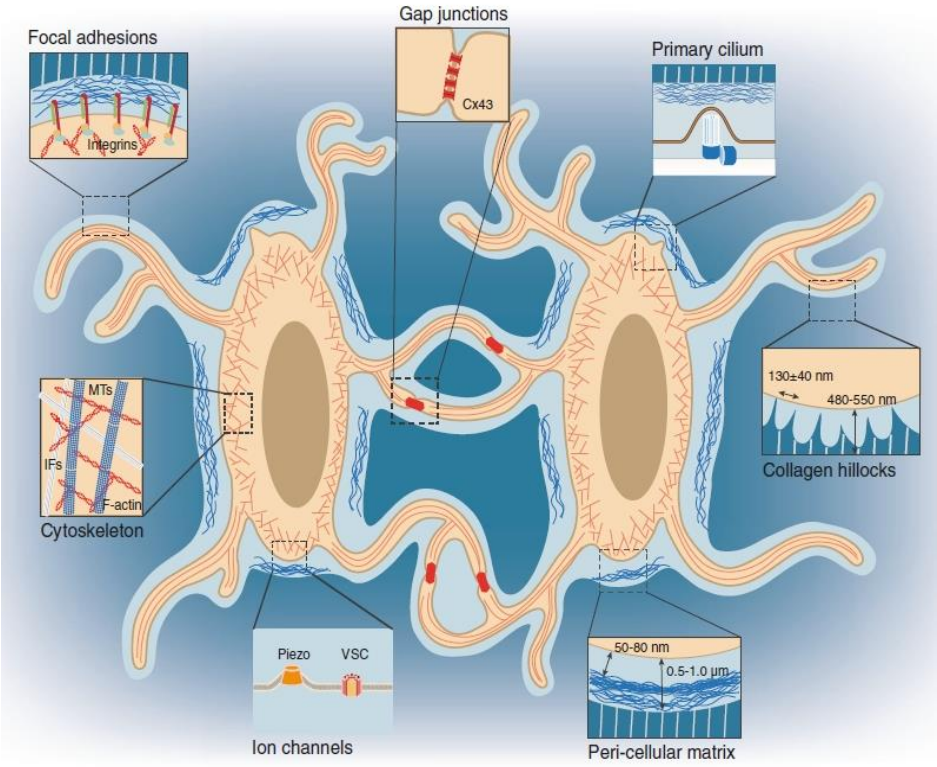


Figure 19 : Principaux mécano-senseurs structuraux des ostéocytes et du système lacuno-canaliculaire. Qin et. al., 2020.

b. Réponse ostéocytaire aux signaux mécaniques

Suite à la perception des signaux mécaniques, différentes voies intracellulaires ostéocytaires sont activées pour la transduction du signal et la sécrétion de plusieurs facteurs afin de contrôler les activités de formation et de résorption (Qin et al., 2020). Les principales voies sont résumées dans la figure 20.

Brièvement, la voie Wnt/β-Caténine est activée par la liaison de Wnt à un complexe de co-récepteurs composé d'une protéine Frizzeld (FZD) et d'une Low-density lipoprotein Receptor-related Protein (LRP) 5 ou 6 (Bonewald & Johnson, 2008). La voie de signalisation qui s'ensuit induit un blocage du protéasome Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) qui détruit de manière constitutive la β-Caténine. De ce fait, il y aura translocation de β-Caténine dans le noyau amenant à une augmentation de l'expression des gènes OPG, OPN et de la production de PGE_2, ainsi que la diminution de l'expression de DKK1 (Dickkopf-related protein 1) et SCLN. Ces deux derniers facteurs peuvent inhiber la voie Wnt/β-Caténine en réalisant une liaison compétitive au récepteur des Wnt.

La stimulation mécanique peut moduler l'expression de SCLN à la baisse par diverses voies comme la prostaglandin – Prostaglandin E2/4 receptor (PGE_2-Ptger2/4) et par action sur les microtubules (Genetos et al., 2011; Lyons et al., 2017). Inversement, il a été démontré que la stimulation mécanique peut réguler à la hausse l'expression de la SCLN par une voie Transforming Growth Factor β (TGFβ) - Smad2/3 (Loots et al., 2012). Ainsi, durant la stimulation mécanique, la voie Wnt/β-Caténine induit l'augmentation de la formation, et est régulée par l'expression de SCLN qui l'inhibe.

La perception du signal mécanique par les intégrines α et β induit des réponses similaires à la voie Wnt/β-Caténine en augmentant l'expression de gènes impliqués dans la stimulation de l'activité de formation. A travers la stimulation des intégrines, une polymérisation des filaments d'actines a lieu et induit une translocation de la protéine Yes-Associated Protein-1 (YAP) dans le noyau induisant entre autre une augmentation du remodelage (Kaneko et al., 2014). Enfin, il est aussi considéré que la stimulation mécanique inhibe l'entrée des ostéocytes en apoptose et en sénescence qui sont deux voies induisant une résorption du tissu osseux.

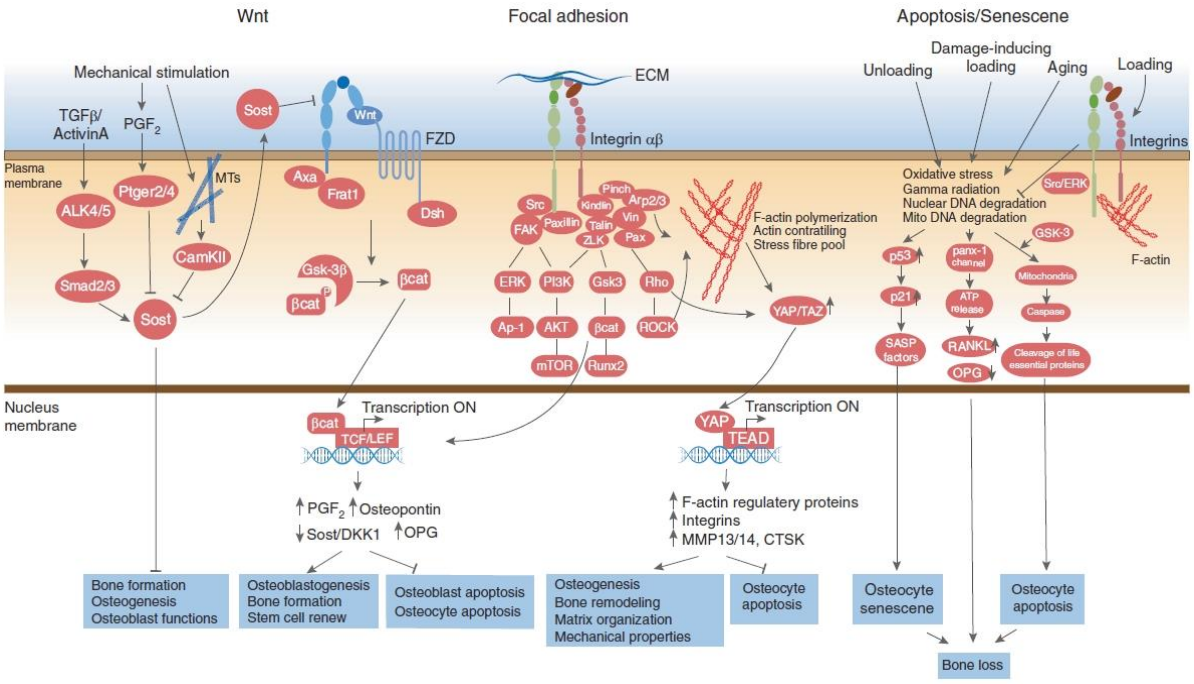


Figure 20 : Principales voies de signalisation de la mécano-transduction ostéocytaire. Qin et. al., 2020.

c. Effets des contraintes mécaniques sur l'intégrité du réseau ostéocytaire

Plusieurs études ont analysé l'architecture du réseau ostéocytaire dans différentes conditions physiologique ou pathologique et ont été recensées dans une revue récente (Vahidi et al., 2020). Celles rapportant l'effet d'une contrainte mécanique sont rares, la plupart étant concentrées sur des modèles de perte osseuse telles que l'ostéoporose suite à ovariectomie ou à la décharge mécanique.

A ce jour, et à notre connaissance, deux études seulement ont été consacrées à cette question. L'une a montré que des souris courant sur un tapis roulant pendant 21 jours présentent une tendance à l'augmentation de la densité ostéocytaire dans l'os tibial (Gardinier et al., 2016). Une autre, portant sur le modèle de zebrafish (poisson téléostéen) a montré que 4 semaines d'exercice dans un tunnel de natation n'affectent ni le volume ni la sphéricité lacunaire des ostéocytes (Suniaga et al., 2018).

Cependant, le point commun entre ces deux études, et qui peut être un élément confondant majeur, est que les analyses n'ont pas été faites uniquement sur l'os déposé pendant le régime de contrainte mécanique, c'est-à-dire qu'un réseau ostéocytaire pré-existant à l'application de la contrainte a été pris en compte pour la mesure des paramètres architecturaux du réseau. Une délimitation des réseaux par des injections de fluorochromes peut permettre de replacer les données sur le réseau ostéocytaire dans la cinétique de l'expérience.

C. Les protéines SIBLING, des composants majeurs de la matrice osseuse

Les composants de la matrice osseuse sont déterminants dans le bon fonctionnement des processus physiologiques décrits précédemment, à savoir le développement, la minéralisation, le modelage, le remodelage et la réponse aux contraintes mécaniques.

Parmi ces composants matricielles se trouvent les PNC qui se distinguent donc du collagène de type I prépondérant dans le tissu osseux. Comme on l'a vu, certaines PNC ont été regroupées dans des familles de protéines qui partagent des points communs structuralement et/ou fonctionnellement. Parmi elles se trouvent les protéines SIBLING (pour Small Integrin Binding LIgand N-linked Glycoprotein), qui ont une origine phylogénétique commune (Kawasaki et al., 2007; Kawasaki, 2011; Kawasaki & Weiss, 2006; Rowe, 2012a). Les SIBLING sont composées des protéines DSPP (Dentin SialoPhosPhoglycoprotein), MEPE (Matrix Extracellular PhosphoglycoprotEin), DMP1 (Dentin Matrix Protein-1), BSP (Bone SialoProtein) et OPN (OsteoPontiN). Ces protéines possèdent peu d'homologie de séquence mais présentent un certain nombre de points communs (Staines et al., 2012):

- Leurs gènes sont localisés sur un même chromosome (ils sont alignés les uns à la suite des autres en 4q21 chez l'Homme et 5qE5 chez la souris).
- Ces gènes présentent des organisations (découpages en exons et introns) similaires.
- Elles possèdent un motif RGD (Arginine-Glycine-Aspartate) qui, par son attachement aux intégrines comme αvβ3, sert d'attachement aux cellules et de médiateur à la signalisation cellulaire.
- Leur séquence inclut un domaine ASARM (pour Acidic Serine Asparte-Rich Motif) qui est un puissant inhibiteur de la minéralisation.
- Elles subissent des modifications post-traductionnelles, telles que des phosphorylations, des sulfatations et des glycosylations, qui déterminent leur rôle biologique.
- A l'exception de la DSPP, les SIBLINGs sont abondamment sécrétées dans la matrice extracellulaire du tissu osseux lors des processus de formation de l'ostéoïde et sa minéralisation (Fisher & Fedarko, 2003). Toutes sont cependant aussi décrites dans d'autres tissus, non minéralisés (rein, glandes, cerveau).

Dans la partie qui suit, nous décrirons succinctement les rôles de la DSPP, de MEPE et de DMP-1 pour nous concentrer plus particulièrement sur la BSP et l'OPN qui font principalement l'objet cette thèse.

1. La sialophosphoglycoprotéine dentinaire (dentin sialophosphoglycoprotein, DSPP)

La DSPP est principalement exprimée dans la dentine. Sa forme non clivée est surtout retrouvée dans le cartilage des condyles mandibulaires où son rôle dans le développement de cette région a été récemment décrit (Ye et al., 2021). Généralement, la DSPP est clivée en trois fragments qui sont la DPP (dentine phosphoprotéine) la DSP (dentine sialoprotéine) et la DGP (dentine glycoprotéine), ce dernier étant issu du clivage de la DSP (Yamakoshi, 2009). Le fragment DPP contient un peptide ASARM et est de ce fait impliqué dans les processus de minéralisation (Tsuchiya et al., 2011). Le fragment DSP est impliqué dans les processus d'initiation de la minéralisation (Suzuki et al., 2009).
Il a été démontré chez l'Homme que des mutations de la DSPP peuvent provoquer une Dysplasie de la Dentine de type 2 (DD-2) et des Dentinogenèses Imparfaites de type 2 et 3 (DGI II et III) (de La Dure-Molla et al., 2015). La DD-2 se caractérise par des anomalies morphologiques de la chambre pulpaire et des calcifications intrapulpaires. La DGI II se caractérise par une dentine ambrée ou opalescente, des racines courtes et une absence de chambre pulpaire. La DGI III quant à elle présente une dentine opalescente mais une chambre pulpaire large. Plusieurs modèles de souris déficientes ou présentant des mutations de la DSPP ont été générés et ont montré des phénotype similaires à ces maladies (Liang et al., 2019; Shi et al., 2020; Sreenath et al., 2003; Verdelis et al., 2008). Dans la matrice osseuse proprement dite (os cortical de souris) l'expression de la DSPP n'est pas, dans l'expérience de notre groupe, détectable en qRT-PCR (Luc Malaval et Mirelle Thomas, données non publiées).

2. La phosphoglycoprotéine matricielle (matrix extracellular phosphoglycoprotein, MEPE)

MEPE est principalement exprimée par les ostéocytes et les ostéoblastes (Nampei et al., 2004). Cette expression augmente lors des processus de minéralisation (Petersen et al., 2000). MEPE contient une séquence ASARM qui se trouve en aval d'un site de clivage spécifique de la cathepsine B (Rowe et al., 2000). Ce clivage, qui libère le peptide ASARM, est empêché par l'endopeptidase membranaire PHEX (PHosphate-regulating gene with homology to Endopeptidases on X-chromosome) par une liaison compétitive sur MEPE (Guo et al., 2002) et potentiellement par une inhibition de la production de cathepsine B (Rowe et al., 2006). Une mutation de PHEX, entraînant donc une libération accrue d'ASARM, est à l'origine du rachitisme hypophosphatémique dominant lié à l'X (Martin et al., 2008). Cette maladie se caractérise par une hypominéralisation des os et des dents ainsi que des taux circulant de FGF23 élevés qui provoquent une augmentation anormale de l'excrétion rénale du phosphate, amenant ainsi à une hypophosphatémie.
L'extinction génique de MEPE chez la souris a montré une augmentation de la masse osseuse expliquée par une stimulation de l'activité de formation retrouvée *in vivo* et *in vitro* (Gowen et al.,

2003). A l'inverse, des souris transgéniques surexprimant MEPE sous le contrôle du promoteur de Col1a1 montrent une diminution des activités de formation et de résorption (David et al., 2009). Ces souris présentent un retard de croissance ainsi que des défauts de minéralisation.

3. La proteine matricielle dentinaire-1 (Dentin Matrix Protein 1, DMP1)

La DMP1 est exprimée dans l'os, la dentine et dans d'autres tissus non minéralisés (Ogbureke & Fisher, 2007; Sun et al., 2011). Dans le tissu osseux, son expression est détectée dans les ostéoblastes en cours de différenciation et surtout dans les ostéocytes (Feng et al., 2002). La DMP1 est principalement impliquée dans la régulation de la minéralisation. Ainsi, les souris déficientes en DMP1 sont hypominéralisées (Ling et al., 2005). Le clivage de DMP1 donne un fragment originaire de l'extrémité N-terminal et un deuxième fragment de l'extrémité C-terminal (Qin et al., 2003). Ce dernier contient le peptide ASARM (Martin et al., 2008). Il a été démontré que la forme non clivée de DMP1 peut avoir un rôle d'inhibition ou de stimulation de la minéralisation selon l'état de phosphorylation de la protéine. *In vitro*, la protéine entière à l'état phosphorylée a montré des effets inhibiteurs sur la formation et la croissance des cristaux d'hydroxyapatite, alors que la forme déphosphorylée a montré des effets inverses. A l'état clivé, les deux fragments générés stimulent la minéralisation (Gericke et al., 2010; He et al., 2003; Tartaix et al., 2004). Enfin, la DMP1 régule la production de FGF23 en formant un complexe inhibiteur avec la protéine PHEX à la surface des ostéocytes (Rowe, 2012b) comme illustré sur la figure 21. De fait les souris déficientes en DMP1 présentent un rachitisme résultant de la surexpression (par ostéocytes et ostéoblastes) du FGF23 (Ling et al., 2005). A noter que le fragment N-terminal de la DMP1 existe sous forme d'un protéoglycane (Qin et al., 2006) qui dans un organe non minéralisé, le cerveau, régule l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (Jing et al., 2018).

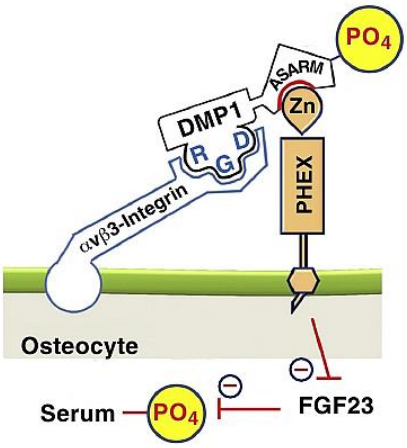


Figure 21 : La phosphorylation de DMP1 sur son motif ASARM provoque la formation d'un complexe αvβ3/DMP1/PHEX. Ce complexe est inhibiteur de la production de FGF23 par les ostéocytes. D'après Rowe et. al., 2012b.

4. La sialoprotéine osseuse (bone sialoprotein, BSP)

La BSP est composée de 303 acides aminés et son poids moléculaire est compris dans une fourchette allant de 70 à 80 kDa (Fisher et al., 1983). Cette variabilité est due au fait que la BSP peut subir une multitude de modifications post-traductionnelles bien documentées (Bouleftour et al., 2016). La BSP est exprimée principalement dans l'os, la dentine et le cartilage minéralisé, mais aussi dans des organes non minéralisés. Dans l'os, les ostéoblastes, les ostéoclastes et les ostéocytes l'expriment abondamment (Bianco et al., 1991; Chen et al., 1991).

Structuralement, la BSP, comme les autres SIBLING, possède une séquence RGD pour l'attachement cellulaire via les intégrines de la famille αv (αvβ3 ou αvβ5, (Ganss et al., 1999)). Des séquences polyglutamiques permettent à la BSP de s'attacher aux cristaux d'hydroxyapatite (Goldberg et al., 2001). Il a aussi été démontré que la BSP possède des sites de liaison au collagène, vraisemblablement au niveau de ses résidus 19-46 (Tye et al., 2005). La BSP se lie aussi aux métalloprotéinases matricielles (Jain et al., 2008). Ces différentes possibilités d'ancrage de la BSP suggèrent un rôle dans l'attachement des cellules osseuses au minéral (Bernards et al., 2008; Forsprecher et al., 2011).

L'un des rôles majeurs de la BSP est la nucléation des cristaux d'hydroxyapatite lors des premières étapes de la minéralisation (Hunter & Goldberg, 1994). Cette action est promue par l'interaction entre la BSP et le collagène (Baht et al., 2008). Les souris présentant une extinction génique (KO pour Knock out) de la BSP ($BSP^{-/-}$) présentent une hypominéralisation osseuse (Bouleftour et al., 2019; Malaval et al., 2008). Le rôle de la BSP dans les mécanismes de minéralisation semble cependant lié à ses modifications post-traductionnelles. Ainsi, les molécules de BSP sulfatées sont retrouvées au niveau des sites de nucléation alors que les formes phosphorylées apparaissent lors de la croissance du minéral (Zhu et al., 2001).

Les études *in vitro* ont montré que la BSP, via son attachement à l'intégrine αvβ3, induit la différenciation ostéoblastique en augmentant l'expression de Runx2, OSX et OCN (Gordon et al., 2007) et la résorption ostéoclastique en induisant une réponse calcique (Paniccia et al., 1993; Raynal et al., 1996). De plus, une synergie d'action entre la BSP et RANKL permet l'activation de NFATC-2 (Nuclear Factor of Activated T-cells Cytoplasmic 2) qui est impliqué dans l'ostéoclastogénèse (Valverde et al., 2005).

Les souris $BSP^{-/-}$ mâles et femelles sont plus petites que leurs homologues sauvages (Malaval et al., 2008). De même, les os longs des souris $BSP^{-/-}$ sont plus courts. Le retard de croissance de ces mutants est le résultat d'une faible prolifération chondrocytaire couplée à une faible résorption du cartilage de croissance (Bouleftour et al., 2014).

Le phénotype osseux architectural des $BSP^{-/-}$ est caractérisé par une masse osseuse trabéculaire plus élevée que les WT qui apparaît chez les souris matures (4 mois, (Bouleftour et al., 2019)). A 4 mois l'activité de remodelage global des $BSP^{-/-}$ chute, ce qui conduit à une accumulation d'os trabéculaire.

La surexpression de la BSP induit un phénotype complémentaire, avec une activité de résorption élevée dès 2 mois d'âge amenant à une réduction du volume trabéculaire (Valverde et al., 2008).
L'os cortical est plus fin chez les souris $BSP^{-/-}$ que chez les souris sauvages du même fond génique. L'histomorphométrie de ce compartiment chez les souris $BSP^{-/-}$ n'a pas été effectuée à ce jour, mais des données moléculaires récemment publiées suggèrent une forte activité, au moins à 2 mois, du fait d'une forte expression de marqueurs de formation (OSX, COLL1, OCN, ALP) et de résorption (RANKL) dans l'os cortical (Bouleftour et al., 2019). De manière intéressante, les souris $BSP^{-/-}$ surexpriment aussi DMP1 et OPN dans l'os cortical des souris jeunes (2 mois d'âge). Elles surexpriment surtout MEPE tout le long de leur vie et à des taux très élevés (~90 fois les valeurs des WT à 2 mois (Bouleftour et al., 2019)).

5. L'ostéopontine (osteopontin, OPN)

L'OPN est formée de 300 acides aminés et a un poids moléculaire allant de 50 à 75 kDa (Sodek et al., 2000). C'est une protéine ubiquitaire dans l'organisme. Dans l'os elle est exprimée par les ostéoblastes, les ostéoclastes (Denhardt & Noda, 1998; Gross et al., 2005) et les ostéocytes (Hoac et al., 2020). Dans le réseau lacuno-canaliculaire, l'OPN est concentrée sur les interfaces ostéocyte-matrice osseuse (McKEE & Nanci, 1995).
Structuralement, l'OPN possède une séquence RGD pour l'attachement cellulaire via plusieurs intégrines dont αvβ5 et αvβ3 (Yokosaki et al., 2005). Elle possède de même des séquences polyaspartate qui lui permettent une liaison avec les cristaux d'hydroxyapatite (Sodek et al., 2000). L'OPN peut se lier avec la fibronectine de manière covalente par transglutamination, ce qui lui confère une liaison au collagène de type I (Beninati et al., 1994; Kaartinen et al., 1999). L'OPN se lie également à la protéine membranaire « Cluster of Differentiation 44 » (CD44) sur sa partie C-terminale (Standal et al., 2004; Weber et al., 1996).
L'OPN a été proposée comme étant un puissant inhibiteur de la minéralisation osseuse, son absence provoquant ainsi une hyperminéralisation osseuse (Boskey et al., 2002). Mais cet effet n'est pas retrouvé de manière systématique dans toutes les souches de souris déficientes en OPN ($OPN^{-/-}$) qui ont été décrites dans notre laboratoire (Bouleftour et al., 2019). L'OPN possède une action chimiotactique vis-à-vis des précurseurs ostéoclastiques (Standal et al., 2004). L'interaction de l'OPN avec l'intégrine αvβ3 est impliquée dans l'activité des ostéoclastes. En effet, cette liaison amorce une voie de signalisation conduisant à la formation des zones de scellement par les ostéoclastes au niveau des foyers de résorption (Duong, 1998; Duong et al., 2000). Cette liaison active est de plus impliquée dans l'adhésion et la migration des ostéoclastes (Kim et al., 2016). Il semble de même que l'interaction OPN-αvβ3 module les flux calciques intracellulaires des ostéoclastes (Miyauchi et al., 1991). D'autres études se sont orientées vers l'interaction OPN-CD44 dans l'activité des ostéoclastes (Chellaiah et al., 2003; Chellaiah & Hruska, 2003; Rittling et al., 1998). Il a été démontré *in vitro* que

les ostéoclastes déficients en OPN sont hypomotiles et possèdent une activité de résorption réduite. Ce phénotype cellulaire a été expliqué par une réduction de l'expression membranaire de CD44, qui est impliqué dans la motilité ostéoclastique. Les ostéoclastes sécrètent de l'OPN dans les lacunes de résorption (Luukkonen et al., 2019).

Les études sur l'action de l'OPN sur l'activité ostéoblastique montrent des données contradictoires. L'OPN a été décrite comme pouvant stimuler la prolifération et l'adhésion ostéoblastique par certains auteurs (Bernards et al., 2008; Forsprecher et al., 2011) alors qu'elle serait inhibitrice de ces activités pour d'autres auteurs (Huang et al., 2004; Kusuyama et al., 2017).

Les souris $OPN^{-/-}$ les mieux caractérisées au niveau du phénotype osseux présentent un même volume trabéculaire que leurs homologues sauvages, ainsi que des activités cellulaires similaires à 2 mois d'âge (Bouleftour et al., 2019). A 4 mois, les $OPN^{-/-}$ présentent un volume trabéculaire plus élevé que les sauvages avec une augmentation de leur taux d'apposition minérale et de leurs surfaces ostéoclastiques, suggérant un remodelage accru. L'os cortical des souris $OPN^{-/-}$ est plus épais que celui des sauvages, au moins à 2 mois. L'expression génique à ce niveau suggère une activité de formation faible, avec une expression d'ALP réduite et une forte expression de SCLN (Bouleftour et al., 2019), mais, comme pour les $BSP^{-/-}$, l'analyse histomorphométrique de ce compartiment restait à faire au début de cette thèse.

D. Interactions fonctionnelles entre l'ostéopontine et la sialoprotéine osseuse

Plusieurs études ont mis en évidence des interactions physiologiques entre l'OPN et la BSP. Tout d'abord, il a été démontré que les souris $BSP^{-/-}$ surexpriment l'OPN dans l'os cortical à 2 mois d'âge (environ x4 l'expression des WT) et dans le sérum jusqu'à 1 an d'âge (Granito et al., 2015). Une surexpression de l'OPN chez des souris $BSP^{-/-}$ a été retrouvée aussi au niveau du périodonte, c'est-à-dire dans les tissus de soutien de la dent (Ao et al., 2017). Sur le plan fonctionnel, il a été démontré que l'injection de siRNA (pour Small interfering RNA ou petit ARN interférant) ciblant le transcrit de l'OPN (siOPN) inhibe l'action anabolique de la PTH en injection locale sur la calvaria des souris $BSP^{-/-}$ mais pas des WT (Bouleftour et al., 2015). Dans cette expérience, la PTH augmente l'expression de la BSP par la calvaria des souris WT. De manière intéressante, l'injection de siOPN à ces souris fait augmenter davantage l'expression de la BSP, suggérant une compensation du manque d'OPN par une surexpression de BSP (Figure 22).

Ces données suggéraient des redondances et interactions complexes entre ces deux protéines, et elles ont conduit à la génération d'un modèle de double KO ($BSP^{-/-}$+$OPN^{-/-}$), par la technique TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease, (Bouleftour et al., 2019)). Brièvement, l'édition génétique a été réalisée par génération d'ARNm codant pour des protéines associant un facteur de

transcription TALE dont la séquence reconnaît des séquences-cible spécifiques de l'exon 5 du gène de l'OPN (*Spp1*) et une nucléase. L'attachement d'une paire de TALEN sur les sites cibles va permettre l'association des nucléases en un dimère fonctionnel qui va réaliser une cassure-réparation double brin précisément localisée. Le clivage se répétera jusqu'à la première erreur de réparation, qui va induire une délétion rendant cette partie du gène non-codante. Les ARNm de ces TALEN ont été injectés *in vitro* dans des œufs obtenus par fécondation *in vitro* d'ovules CD1 avec des spermatozoïdes $BSP^{-/-}$ (où les deux gènes de la BSP (*Ibsp*) étaient invalidés). Les TALEN ont donc agit sur des génomes hétérozygotes pour le KO de la BSP ($BSP^{+/-}$). Les œufs ont été ensuite réimplantés, et les souris obtenues par la suite ont subi des rétrocroisements sur plusieurs générations et de multiples criblages jusqu'à obtenir des souris $OPN^{-/-}$ (pour lesquelles la mutation n'a concerné que le chromosome portant un gène *Ibsp* fonctionnel) et DKO (comportant des mutations invalidantes des gènes *Spp1* et *Ibsp*).
Les souris DKO ont montré un phénotype osseux distinct des souris $BSP^{-/-}$ et $OPN^{-/-}$. Dans l'os trabéculaire, les DKO possèdent un volume osseux plus bas que les WT à 2 mois d'âge avec des activités cellulaires plus élevées. A 4 mois, les DKO ont un volume trabéculaire et des activités cellulaires identiques aux WT. Dans l'os cortical, à 2 mois comme à 4 mois, les DKO présentent une épaisseur corticale similaire au WT accompagnée d'une hypominéralisation et d'une macroporosité. Le profil d'expression génique de l'os cortical à 2 mois d'âge des DKO a été publié et a montré plusieurs similitudes avec les $BSP^{-/-}$ comme une surexpression de marqueurs de formation et de résorption, suggérant une activité de remodelage accrue, et surtout la même surexpression de MEPE (Figure 23).

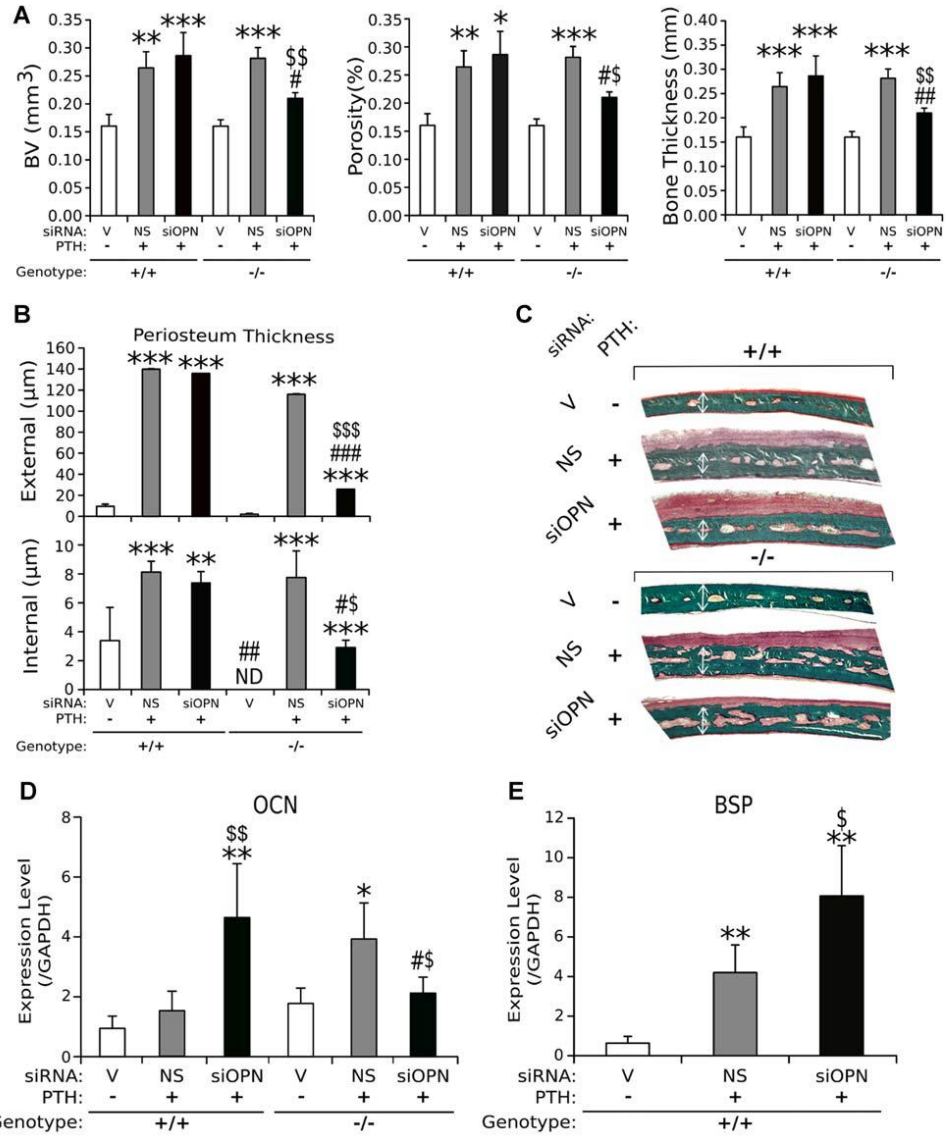


Figure 22 : Effets de l'injection de siOPN sur l'effet anabolique de la PTH sur la calvaria de souris WT et BSP$^{-/-}$. Bouleftour et. al., 2015.

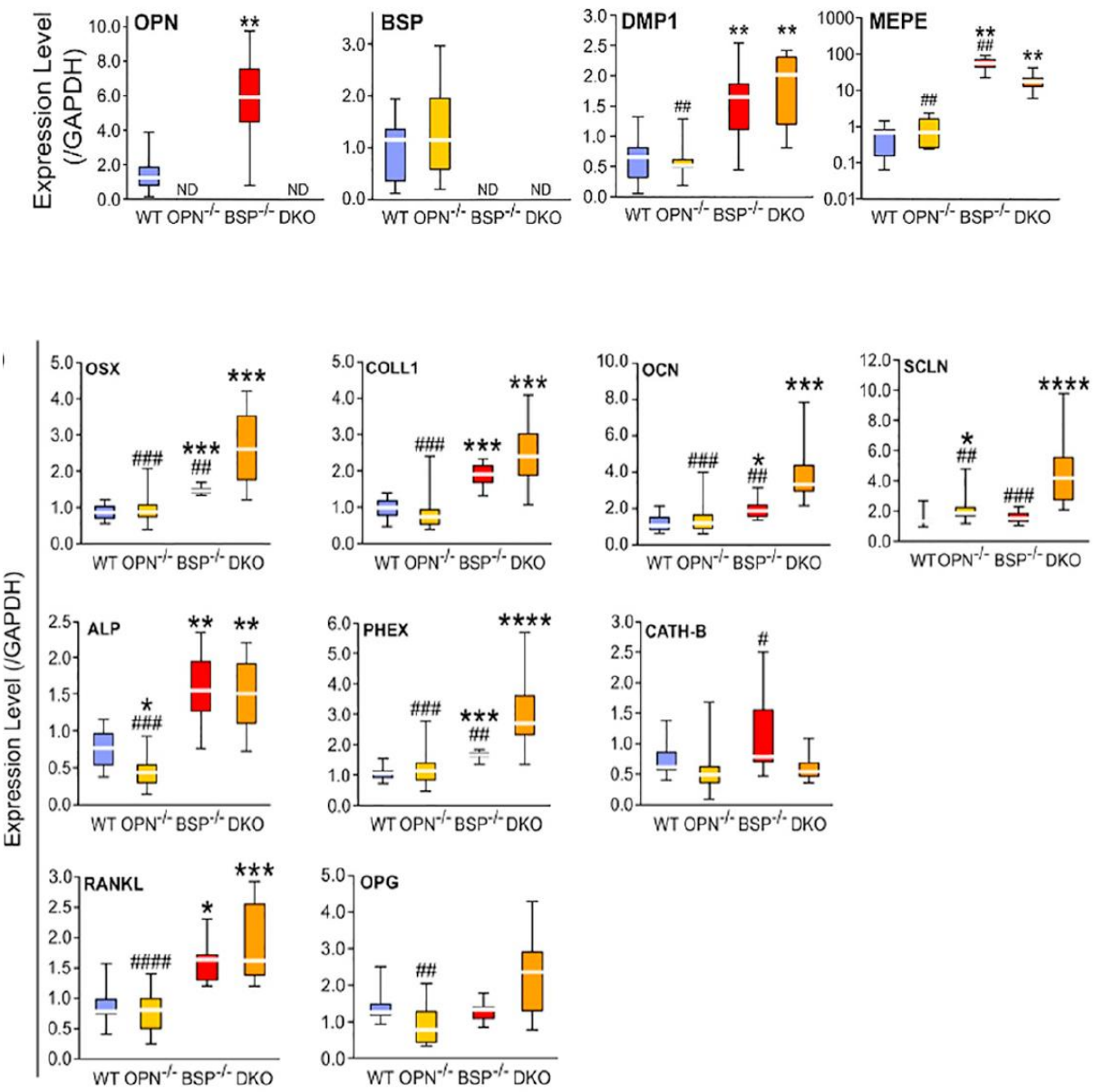


Figure 23 : Expression des marqueurs osseux dans l'os cortical de souris WT, OPN$^{-/-}$, BSP$^{-/-}$ et DKO âgées de 2 mois. Bouleftour et al., 2019.

E. L'ostéopontine et la sialoprotéine osseuse sous contrainte mécanique

Plusieurs études ont montré une surexpression de la BSP et de l'OPN sous contrainte mécanique (travaux résumés dans le Tableau 2). La plupart de ces travaux montrent surtout une expression rapide qui chute quelques heures ou quelques jours après l'application de la contrainte. Cette expression a été corrélée à la réponse ostéogénique des tissus soumis à un stimulus mécanique.

A ce jour, aucune étude n'a analysé l'effet de l'absence de BSP sur la réponse à une contrainte mécanique. Pour l'OPN, ce travail a été effectué dans deux études. Dans un modèle *in vitro*, il a été démontré que des cellules osseuses primaires cultivées à partir de fragments d'os longs de souris $OPN^{-/-}$ présentent un déficit de production d'oxyde nitrique (NO) sous un flux de fluide pulsatile (Denhardt & Noda, 1998). *In vivo*, sur la calvaria (os de la calotte crânienne) une étude a montré qu'après expansion forcée de la suture sagittale, les souris $OPN^{-/-}$ referment moins rapidement leur suture que leurs homologues sauvages (Figure 24), en partie parce que l'activité de formation est moindre (Morinobu et al., 2003).

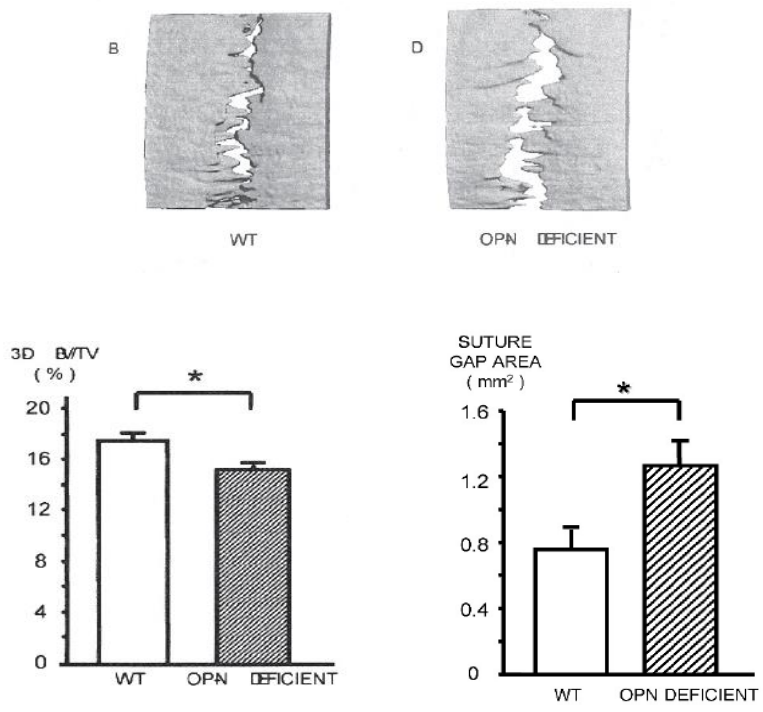


Figure 24 : Fermeture de la suture sagittale du crâne induite par expansion forcée chez des souris WT et $OPN^{-/-}$. Les images du haut sont des représentations 3D des sutures. Le graphe de gauche représente le volume osseux. Le graphe de droite représente l'aire de l'espace entre les deux os pariétaux. Morinobu et. al., 2003.

Tableau 2 : Résumé des études ayant analysé l'effet de contraintes mécaniques *in vitro* ou *in vivo* sur l'expression génique de l'OPN et de la BSP.

Modèle	Contrainte appliquée	Effets	Référence
Cellules MC3T3-E1	Ecoulement laminaire de fluide à 1 Pa, 1Hz pendant 1h	Surexpression d'**OPN** (ARNm : x3)	(Malone et al., 2007)
Cellules MC3T3-E1	20g d'hyper-gravité pendant 24h	Surexpression d'**OPN** (ARNm : x2 ; protéine : x1.8)	(Zhou et al., 2015)
Cellules ROS 17/2.8	Force compressive intermittente à 13kPa, 18 cycles/min pendant 48h	Surexpression d'**OPN** (ARNm : après 12h de contrainte puis retour à l'état de base à 48h ; protéine : x1.4 à 48h)	(Kubota et al., 1993)
Cellules UMR 106	Champs magnétiques statiques à 300 et 800 Gauss pendant 24h	Surexpression de **BSP** (ARNm : x2.2 pour 300 Gauss et x2.7 pour 800 Gauss)	(Shimizu et al., 2004)
Cellules hMSC et hASC	Pression hydraulique compressive à 1 Psi, 1Hz, 10 min toutes les 12h durant 7 jours	Surexpression d'**OPN** (ARNm : x1.7 (hMSC) ; IF : ▲ aire et intensité pour hMSC et hASC) Surexpression de **BSP** (ARNm : x3 (hMSC), x2 (hASC) ; IF : ▲ aire et intensité pour hMSC et hASC)	(Park et al., 2012)
Cellules hPLF	Centrifugation à 20, 50, 100 et 150 g/cm^2 pendant 60 min	Surexpression d'**OPN** (ARNm : augmentation à toutes les conditions ; protéines : augmentation à 20 et 50 g/cm^2)	(Hong et al., 2010)
Cellules UC-MSC	Mise sous tension par force de traction à l'aide d'un sous vide à 5% ou 10%, 5sec puis 15 sec repos pendant 10 jours	Surexpression d'**OPN** (ARNm) à 5%	(Kang et al., 2012)
Cellules BMSC	Force de cisaillement par écoulement de fluide à 1,6 dyn/cm^2 pour 5, 30 ou 120 minutes	Surexpression d'**OPN** (ARNm à 30 min ; protéines à 5, 30 et 120 minutes) Surexpression de **BSP** (ARNm à 30 et 120 minutes)	(Kreke et al., 2005)
Cellules rMSC	Force d'étirement à 5%, 1Hz, durant 4h pendant 3 jours	Surexpression d'**OPN** (ARNm)	(Byrne et al., 2008)
Cellules MC3T3-E1	Compression hydraulique intermittente à 13kPa, 0,3Hz pendant la prolifération ou la différentiation	Surexpression d'**OPN** (ARNm : x1.5 en prolifération et x2 en différentiation)	(Klein-Nulend et al., 1997)
Cémentoblastes de racines de dents de bovins nouveaux-nés	Force de traction à 2000 ou 4000 με, à 0,5Hz, pendant 3, 6, 12, 24 ou 36 heures	Surexpression de **BSP** dès 3h de contrainte avec un pic à 24h (ARNm : x10 à 2000 με et x6 à 4000 με) et rechute à 36h	(Yu et al., 2009)
Cellules Soas-2	Force compressive continue à 0.5, 1, 2 ou 3 g/cm^2 pour 1, 3, 6, 9, 12 ou 24h	Surexpression d'**OPN** (ARNm à 1g/cm^2 ; de 1 à 6h ; protéines à 1g/cm^2 : de 1 à 12h) Surexpression de **BSP** (ARNm : augmentation graduelle surtout à 1 g/cm^2 à partir de 3h et jusqu'à 24h ; protéines à 1g/cm^2 : de 3 à 24h)	(Mitsui et al., 2005)
Cellules MC3T3-E1	Force de cisaillement par écoulement de fluide à 2N/m^2, 1Hz,	Surexpression d'**OPN** (ARNm : x4 après 24h)	(You et al., 2001)
Cellules hPDLC	Centrifugation à 80g pendant 1, 2, 6, 8 et 12h	Surexpression d'**OPN** (ARNm : augmentation de 1h à 12h) Surexpression de **BSP** (ARNm : augmentation de 6h à 12h)	(Jiang & Tang, 2018)
Cellules MC3T3-E1	Force compressive faible (1.4 à 1.9 με), moyenne (2.8 à 3.7 με) et forte (4.2 à 5.6 με)	Surexpression d'**OPN** (ARNm : x4 à 4.2 με après 72h)	(Owan et al., 1997)
Rats mâles Sprague-Dawley	Insertion d'un morceau d'élastique entre les premières et deuxièmes molaires supérieures pendant 6 à 288h	Surexpression d'**OPN** (ARNm : augmentation de 12h à 48h puis chute jusqu'à 96h ; ostéocytes positifs à l'OPN : augmentation après 48h)	(Terai et al., 1999)
Souris 129/SV	Force d'expansion de la suture sagittale à 20g	Surexpression d'**OPN** (ARNm : dans la calvaria ; protéines : accumulation d'OPN dans les zones de formation sur les bords internes de l'os pariétal au niveau de la suture élargie	(Morinobu et al., 2003)
Rats femelles Sprague-Dawley	Flexion à 4 points sur le tibia droit à 65N, 2Hz pendant 3 min	Surexpression d'**OPN** (ARNm : x4 après 6h et 24h)	(Miles et al., 1998)
Lapins néo-zélandais femelles	Fléchissement du troisième doigt d'une patte avant à 0,42N, 1Hz, 2h/jour, 3 fois par semaines durant 10 semaines	Augmentation du marquage IHC d'**OPN** dans le cartilage articulaire de l'articulation du troisième doigt ayant reçu la contrainte	(King et al., 2005)

F. Objectifs de la thèse

L'ensemble des éléments présentés ci-dessus souligne l'importance de la BSP et de l'OPN dans la physiologie osseuse à travers :

- Leurs effets sur les activités cellulaires de formation (vitesse et minéralisation) et de résorption.
- Leurs interactions croisées mises en évidence par des extinctions géniques (surexpression d'OPN chez les $BSP^{-/-}$, phénotype osseux distinct des DKO) ou sous stimulation hormonale (PTH).
- Leur surexpression rapide à la suite des contraintes mécaniques.

L'objectif de cette thèse était de s'appuyer sur les modèles de génétique expérimentale disponibles et déjà largement décrits dans notre groupe, ainsi que sur ses plateformes uniques et son expertise en matière d'expérimentation animale pour explorer le rôle de ces deux protéines aux fonctions associées dans la réponse osseuse aux contraintes mécaniques.

Pour ce faire, deux modèles de stimulation mécanique testés et validés par notre laboratoire, la vibration du corps entier (WBV) et l'hypergravité (HG), ont été appliqués à des souris $BSP^{-/-}$, $OPN^{-/-}$ et DKO, et l'adaptation de leur squelette à ces défis mécaniques a été analysée par des approches d'imagerie tomographique, d'histomorphométrie et de biologie moléculaire.

II) Travaux réalisés

Une première partie présente les effets des deux régimes de contrainte sur les données architecturales, histomorphométriques et d'expression génique des 4 génotypes. Elle fait l'objet d'un article finalisé, et sera présentée sous forme de « pre-print ».

Une deuxième partie, présentée de manière moins formelle, développera l'analyse détaillée de la cinétique de réponse de l'os cortical de souris des quatre génotypes soumises à la WBV, ainsi que l'impact de ce défi sur le réseau lacuno-canaliculaire. Nous y utiliserons des techniques d'histomorphométrie récemment mises en place dans notre laboratoire et qui ont été réadaptées dans cette thèse pour répondre aux questions biologiques propres à notre étude. De ce fait les différentes étapes de la méthode utilisée seront détaillées et accompagnées d'annexes méthodologiques.

A. Evidence of interplay between Osteopontin and Bone Sialoprotein in the skeletal response to mechanical stimulation: single and double knockout mice under hypergravity and whole body vibration (article en cours de publication)

M. Maalouf, H. Çinar, W. Bouleftour, M. Thomas, N. Laroche, A. Vanden-Bossche, L. Peurière, M. T. Linossier, S. Peyroche, M. H. Lafage-Proust, L. Vico, A. Guignandon, L. Malaval.

LBTO, INSERM, U1059-SAINBIOSE, Université de Lyon, F 42270 Saint Priest En Jarez.

Corresponding author :

Dr Luc Malaval

LBTO, INSERM, U1059-SAINBIOSE

Université de Lyon - Université Jean Monnet

Pole Santé Nord - Faculté de Médecine, Rm 118

10 Chemin de la Marandière

F 42270 St Priest en Jarez, France

T: 33477421444

e-mail: luc.malaval@univ-st-etienne.fr

Supplementary Information added to the submission:

- 4 Supplementary Tables

- 2 Supplementary Figures

Abstract

Osteopontin (OPN) and Bone Sialoprotein (BSP), two proteins co-expressed in bone and involved in remodeling and mineralization, display overlapping and complementary properties. Both genes show a rapidly increased expression in response to mechanical stimuli, suggesting a role in skeletal adaptation to loading. To clarify their respective functions in this process, we tested Wild-type (WT), BSP knockout ($BSP^{-/-}$), OPN knockout ($OPN^{-/-}$) and BSP+OPN double knockout (DKO) mice in two models: hyper-gravity (HG, 2G, 3 weeks) and whole body vibration (WBV, 2G, 90Hz, 15min/day, 5 days/week, 6 weeks).

HG increased trabecular bone volume (BV/TV) in the distal femur of WT (+20%, $p<0.05$) and $BSP^{-/-}$ mice (+27%, $p<0.05$). In contrast, HG decreased BV/TV in $OPN^{-/-}$ femur (-21%, $p<0.05$) and did not affect DKO mice. HG reduced osteoclast surfaces (Oc.S/BS) in WT (-21%, $p<0.05$) and increased bone formation rate (BFR/BS) in $BSP^{-/-}$ mice (+41%, $p<0.05$). Oc.S/BS increased under HG in $OPN^{-/-}$ mice (+51%, $p<0.01$). WBV did not affect WT and DKO bone but increased cortical thickness in $BSP^{-/-}$ mice (+7%, $p<0.01$) and decreased it the $OPN^{-/-}$ (-9%, $p<0.01$). WBV increased endocortical BFR/BS (+40%, $p<0.01$) in $BSP^{-/-}$ mice, and reduced their periosteal Oc.S/BS (-68%, $p<0.05$), along with decreased RANKL and CathK expression in cortical bone. In contrast, endocortical BFR/BS decreased in vibrated $OPN^{-/-}$ mice (-54%, $p<0.01$) while endocortical Oc.S/BS increased (+95%, $p<0.05$). In summary, while HG and WBV skeletal effects targeted distinct bone compartments, under both treatments absence of OPN induced bone loss, while lack of BSP resulted in bone gain. Strikingly, the absence of both proteins lead to a relative insensitivity to either mechanical regimens. Interplay between OPN and BSP thus appears to be a key element of skeletal adaptation to mechanical stimulation.

Key words: Hyper-gravity, Whole Body Vibration, Osteopontin, Bone Sialoprotein, Knockout

Introduction

Mechanical loading ensures the maintenance of bone mass within a defined range of strains and in the absence of biological functional defects. The primary source of mechanical inputs on the skeleton is body weight, generated by the gravitational force. In a condition of unloading such as space flight microgravity, the body is in mechanical discharge, leading among other effects to bone loss (1,2). This bone loss can also be found by the sedentary lifestyle and situations of immobilization. In contrast, hyper-gravity (HG) accentuates the effect of body weight and has been shown in murine models to result in bone gain, its osteogenic effect being mainly documented at 2G acceleration (3–5).

In a more general situation, i.e. physiology on earth, any mechanical stimulus added to the weight might increase the signal perceived by bone. The mechanical impacts that the whole body receives daily (by physical activity or walking for example) are transmitted in large part by a vibratory signal. Physical activity has been shown to increase bone mass and limit the risk of fractures (6,7). In order to simulate the beneficial effects of physical activity in people with bone pathologies and/or disabilities and in menopausal women (8,9), whole body vibration (WBV) is often described as a promising therapy. WBV aims to simulate an external mechanical impact by applying an oscillatory movement on a body while controlling different parameters such as acceleration in G and frequency in Hz. Studies on the effects of different WBV settings on bone have been largely performed in murine models, in basal conditions such as during growth or on aged rodents (10–13), or in bone-compromising situations such as fracture and/or ovariectomy (14,15). Our laboratory has previously validated both HG and WBV mechanical stimulation models in control (C57Bl/6) mice. These studies showed that each protocol displays structural effects targeting a specific bone compartment (3,10). For a 2G acceleration, HG increases trabecular bone mass (3), whereas WBV (at 90Hz) accelerates cortical bone accrual (10).

On the bone tissue side, several biological markers are well known to be elements of mechanical adaptation, i.e. playing a role in the perception and/or response of the skeleton to mechanical loading. Osteopontin (OPN) and Bone Sialoprotein (BSP) have been shown in many models to be rapidly expressed by bone cells in response to mechanical stimulation, thus becoming early markers of bone's perception of loading (16–19). Together with Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein (MEPE), Dentin Matrix Protein-1 (DMP1) and Dentin Sialophosphoprotein (DSPP), OPN and BSP form the SIBLING (Small Integrin Binding Ligand N-linked Glycoproteins), a family of related bone matrix components whose genes are aligned on the same chromosome (4 in human, 5 in mouse (20,21)). In a 129sv/CD1 mouse genetic background (wild-type, WT) single gene knockouts of BSP ($BSP^{-/-}$, (22)), OPN ($OPN^{-/-}$, (23)), as well as a double knockout ($BSP^{-/-}$ + $OPN^{-/-}$ = DKO, (23)) have been developed. Young (2 month old) $OPN^{-/-}$ mice present with a thicker femur cortical bone than WT, while $BSP^{-/-}$ cortices are consistently thinner (23); also, young $OPN^{-/-}$ trabecular bone presents with thicker and less numerous trabeculae than other genotypes. We generated DKO mice because of the evidence of

physiological interactions between BSP and OPN in bone (24) and because $BSP^{-/-}$ mice over-express OPN protein in bone tissue and in blood (25,26).

Only one study looked at the effect of increased mechanical stress on $OPN^{-/-}$ mice in the skull bones and showed a delay in formation activity under tensile mechanical stress (17). However, no study to date has looked at the effects of loading on other bone compartments of $OPN^{-/-}$, $BSP^{-/-}$ or DKO mice. Because respective OPN and BSP deletions affect cortical bone in opposite ways and trabecular bone in a relatively same manner, we tested our mice under both HG and WBV to take advantage of their compartment-specific effects. Our results confirm in a different mouse background the respective effects of HG and WBV regimens on cortical and trabecular bone, but also show that their actions converge in the biological outcome for each genotype. Under both HG and WBV, the absence of OPN reverses the physiological response by inducing bone loss, and the absence of BSP induces or potentiates bone gain, while the non-expression of both proteins results in bone insensitivity.

Materials & Methods

Animal care

Wild type (WT) 129sv/CD1 mice, along with $BSP^{-/-}$, $OPN^{-/-}$ and DKO mice under the same genetic background were used in the experiments. $BSP^{-/-}$ mice have been generated by homologous recombination (22). $OPN^{-/-}$ and DKO mice were engineered through targeted deletion, using the Transcription Activator-Like Effector nuclease (TALEN) technique on a $BSP^{+/-}$ background, as described (23). For line maintenance and experimentation, the animals were housed and bred in the PLEXAN facility (Platform for Experiments and Analysis, Faculty of Medicine, University Jean Monnet of Saint-Etienne, Saint-Etienne, France). Mice were kept at standard temperature (23±2°C), in a light-controlled environment (12 h light/12 h dark cycle) and were fed a standard pellet diet (SAFE A03, Safe, Augy, France) with water ad libitum. All animal experiments have been approved by the local ethical committe (Comité d'Ethique en Experimentation Animale de la Loire CEEAL-UJM, agreement Nr°98) and the Animal Welfare Committee of the PLEXAN. After screening by the CEEAL-UJM, HG experiments received approval from the national authority (Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, APAFIS Nr 8160-2016112415129882 v6). The procedures for the care and killing of the animals were in accordance with the European Community Standards on the care and use of laboratory animals (Ministère de l'Agriculture, France, Authorization Nr°42-18-0801).

Hyper-gravity regimen

A 1.4m radius centrifuge with four peripheral gondolas which is an open facility owned by CNES (Centre National d'Etudes Spatiales, Paris, France) is associated with an electronic control system (COMAT Aérospace, Flourens, France) and is housed in the PLEXAN facility and was used as described ((3), Figure 1A). All gondolas are equipped with a camera-based monitoring system to track the behavior of the animals and the food/water stocks (Figure 1B). Two-month-old male mice of all 4 genotypes were separated between controls, kept at normal gravity (1G) and a centrifuged group (n=10 mice/group). Cages of the 2G groups were transferred into the gondolas (10 mice/cage/gondola, Figure 1B), and the centrifuge was run at 2G acceleration for 3 weeks, with a weekly 5 minute stop to weigh the mice and renew food and water. Each start (1G to 2G) and each stop (2G to 1G) of the centrifuge lasted 40 seconds. Control cages were kept in the centrifuge room to homogenize environmental factors.

Whole body vibration regimen

Shaker platforms (TIRA Vibration Test Systems TV 52120, Schalkau, Germany) on which aluminum discs (30cm diameter, 4mm thickness) are attached were used to generate vibrations as described

((10), Figure 1C). The g-level was controlled by an accelerometer (PBB Piezotronics, 100mV/g, ref 352C33) taped under the disc at midradius distance. Two-month-old male mice of all 4 genotypes were separated between controls (CT, n=10) and vibrated (VB, n=10). During each WBV session, all mice from the same cage (n=5 mice/cage) were put on the shaker's disc and left free to move (Figure 1C). For VB mice, the plates were accelerated at 2G, at a 90 Hz frequency (sinusoidal signal) for 15 min/day, 5 day/week (Monday to Friday) during 6 weeks. CT mice were put on an inactive shaker for 15 minutes during the vibration sessions, alternating with the VB.

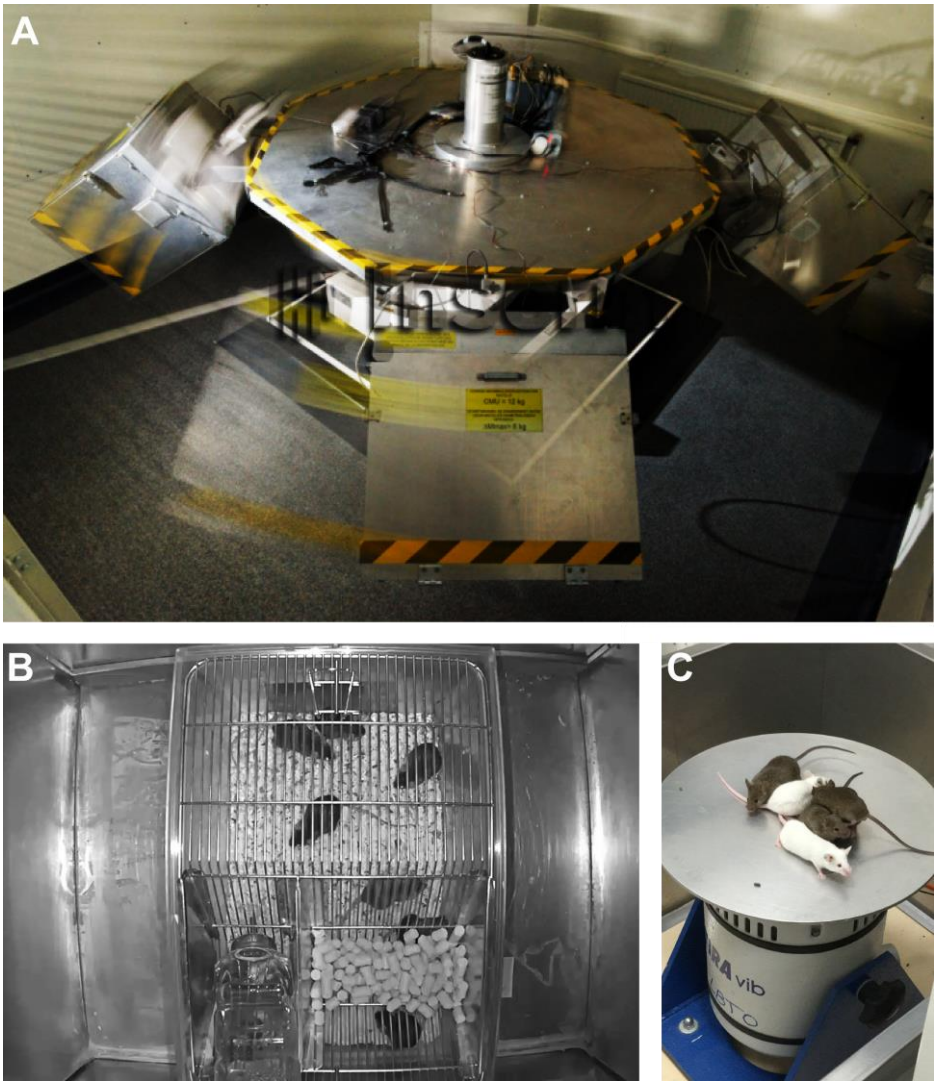


Figure 1: Devices used for mechanical stimulation on mice. For hyper-gravity experiment (A) the centrifuge is composed of a central disc and four peripheral gondolas. (B) The gondolas are designed to hold rodent cages and are equipped with a video surveillance system to monitor animal behavior as well as food and water supplies. For whole body vibration experiments, (C) the mice are placed on an aluminum disk that is attached to a shaker platform during the vibration session.

Tetracycline labelling and sample collection

In order to label bone formation surfaces, all mice were injected with 30 mg/kg tetracycline (TTC, Sigma-Aldrich) in saline solution, seven days and three days before killing. At the respective ends of HG and WBV experiments, all mice were euthanized and femora, vertebrae and tibiae were collected.

Microtomography

For microtomographic (µCT) analysis, formalin-fixed and ethanol dehydrated femur and second lumbar (L2) vertebra were scanned with a Viva CT40 tomograph (Scanco Medical, Bassersdorf, Switzerland) in accordance with American Society for Bone and Mineral Research guidelines (27). Data were acquired at 55 keV with a 145 mA current and a 10 µm isotropic cubic resolution. Three-dimensional reconstructions were generated using the following parameters: σ=1.2; support=2; threshold=245 for trabecular bone and 280 for cortical bone.

The structural parameters of trabecular bone, bone volume/trabecular volume (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular number (Tb.N), trabecular separation (Tb.Sp), structure model index (SMI) and density of connections (Conn.D) were measured in a set of 150 sections above the distal growth plate of the femur and from all sections between the two growth plates of the L2 vertebra, within Regions of Interest (ROI) excluding primary trabecular bone and cortical bone, manually defined by the same operator on transversal 2D images. The structural parameters of the femur midshaft, cortical thickness (Ct.Th), total cross sectional area (Tt.Ar), cortical area (Ct.Ar), marrow area (Ma.Ar), cortical porosity (Ct.Po), maximal (Imax) and minimal areal moment of inertia (Imin), polar moment of inertia (pMOI = Imax + Imin), maximal radius perpendicular to Imax direction (Cmax), minimum radius perpendicular to Imin direction (Cmin), section module (Imax/Cmax and Imin/Cmin) and tissue mineral density (TMD), as calibrated with an HAP phantom, were calculated by integration of the value on each transverse section of a set of 60, starting 500 sections (5 mm) above the distal growth plate.

Local cortical thickness measurements were performed on the 30th section of each cortical image stack using the tomographic software. Along the transverse (longest) axis of the cortical bone image, local thickness measurements were made every 45 degrees to compartmentalize the cortical bone into several anatomical sectors.

Histomorphometry

After µCT analysis, femur bones were cut in two with a Dremel model 395 electric drill fitted with a diamond blade (Dremel Multipro, Breda, Netherlands) at the lower two-thirds of their length. Both parts were embedded in methyl-methacrylate.

The distal metaphysis was cut longitudinally with a tungsten-carbide-bladed microtome (Leica SM2500E, Wetzlar, Germany) to obtain 9 µm slices. These were stained with modified Goldner's

trichrome or with tartrate-resistant acid phosphatase (TRAcP) histochemistry for osteoclasts, or were left unstained. The software Bone v.3.50 (Explora Nova, La Rochelle, France) coupled to a camera MicroFire (Optronics, Goleta, United States) and a microscope Leitz DMRB (Leica, Wetzlar, Germany) were used to take images of Goldner-stained sections and to measure on them the fractional trabecular bone volume inside the ROI (BV/TV, on %) and trabecular thickness (Tb.Th, in µm) in order to normalize the measurement of cellular bone parameters. The latter were analyzed in a live way via developed in-house software coupled to a digitizing table Summasketch III (Summagraphics, Paris, France) and a microscope Axio Scope.A1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Bone formation was assessed on unstained sections by measuring single (sLs/BS) and double TTC labeled surfaces per bone surface (dLs/BS) and derive mineralizing surfaces per bone surface (MS/BS, in %, with MS = 0.5*sLs+dLs). The mineral apposition rate (MAR, in µm/day) was assessed as the distance between double labels (measured at equidistant locations separated by about 30 µm). The bone formation rate per bone surface (BFR/BS, in $\mu m^3/\mu m^2$/day) was calculated as (MS/BS)*MAR. Osteoclast surfaces per bone surface (Oc.S/BS, in %), osteoclast number per bone perimeter (N.Oc/B.Pm) and osteoclast mean length (Oc.Le) were measured on TRAcP stained sections, after counter-staining with light green. All histomorphometric measurements on femoral trabecular metaphyseal bone were performed up to 1.5 mm above the distal growth plate, excluding primary trabecular bone and cortical bone in order to fit with the ROI of the µCT analysis. Histomorphometry results for each mouse are averages of measurements done on 5 sections.

The midshaft part of the femur was cut transversely with a diamond-coated wire (Escil, Precision Diamond Wire Saw, Chassieu, France) into 300 µm slices. One slice per mouse, taken within the midshaft area assessed in µCT, was chosen to measure in a live way the cellular activity parameters, as described previously. Bone formation parameters, mineralized perimeter per bone perimeter (MPm/BPm, in %), MAR and BFR per bone perimeter (BFR/BPm, in $\mu m^2/\mu m/d$) were measured on the unmounted section, kept flat on a slide with a few drops of alcohol during analysis. The section was then gradually rehydrated, TRAcP-stained, mounted and re-analyzed for osteoclast perimeter per bone perimeter (Oc.Pm/BPm, in %). All measurements were done on endocortical (Ec.) and periosteal surfaces (Ps.) separately, and on both surfaces of each slice, whose values were averaged.

Real-Time PCR

For quantitative real-time PCR analysis (RT-qPCR) of the cortical bone, collected tibiae were cleaned from connective tissue, their shafts were cut-out and flushed with sterile PBS, then crushed in liquid nitrogen with a mixer mill (Sartorius, Gottingen, Germany) using steel balls before extraction with Tri-Reagent (Sigma-Aldrich). In HG experiment, the bone shaft of fresh tibiae was alternatively flushed with Tri-Reagent. RNA harvested with Tri-Reagent was purified on columns according to the manufacturer's instructions (Rneasy Plus Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany). RNA amounts were

assessed with the Ribogreen kit (Invitrogen, Life Technologies, Eugene, OR, USA) and their quality checked with the Experion automated electrophoresis station (Bio Rad, Hercules, CA, USA). Messenger RNA was reverse transcribed (iScript cDNA synthesis Kit, Biorad) according to manufacturer's instruction, then 400 ng of cDNA were amplified through qRT-PCR using the SYBR Green I dye (Lightcycler faststart DNA masterSYBR green I, Roche, Germany). Primer sequences for the genes of interest are given in Table S1. The expression of the housekeeping gene (GAPDH) did not vary significantly within or between genotypes in either experimental setting (data not shown).

Statistics

Weight curves were compared by 2-way ANOVA (time and mechanical challenge). For all other data, inter-group comparisons were performed with Fisher's *t*-test whenever the conditions of normality (Shapiro-Francia test) and homoscedasticity (*F*-test) were verified. In non-normality conditions, the non-parametric Wilcoxon-Mann-Whitney *U*-test was used.

Results

Bone phenotype of wild type and mutant mice

The bone phenotypes of the 4 mouse lines used in this study has been extensively described (22,23,28). Briefly, the trabecular BV/TV of the distal femur in $BSP^{-/-}$ and $OPN^{-/-}$ mice is similar to WT at 2 months (the start of our experiments) and increases to values higher than WT (~+25%) in mature, 4 months old mice (23). DKO mice have lower values (-30%) at 2 months that reach WT values by 4 months (23). At the end of our experiments $OPN^{-/-}$ values were already higher than WT, while $BSP^{-/-}$ values, although systematically higher, were still within WT range (Tables S2, S4). $BSP^{-/-}$ mice are characterized by thinner cortices than WT, while $OPN^{-/-}$ cortical bone is thicker (23). DKO cortical bone has the same average Ct.Th as WT, but presents remarkable macro-porosities in the posterior part of the midshaft (23). These data are found at the end of our experiments between control mice with in addition no difference in the calculated biomechanical parameters such as pMOI, Imax, Imin, Imax/Cmax and Imin/Cmin (Table S4).

Hyper-gravity induces trabecular bone loss in $OPN^{-/-}$ mice, in contrast to bone gain in $BSP^{-/-}$ mice

Video observations showed that 2G mice stayed largely still during the first week, then started to move around in the cage for the rest of the experiment. The weight gain curve was lower at 2G than at 1G for WT and $OPN^{-/-}$ mice, with a similar trend for $BSP^{-/-}$ and DKO, although the final weight of 2G mice was <1G only for the WT (Figure S1). No difference in femur length was observed between the 1G and 2G mice in either genotype (Table S2).

Under HG, WT and $BSP^{-/-}$ mice increased their trabecular BV/TV and Tb.Th in the distal femoral metaphysis with the addition of an increase of Conn.D for $BSP^{-/-}$ mice (Figure 2, Table S2). Strikingly, $OPN^{-/-}$ mice lost trabecular BV/TV (-27%), Tb.N (-17%) and Conn.D (-20%) under HG, with no change for the DKO (Figure 2). Similar effects of HG were observed in L2 vertebrae for all genotypes except the WT, which showed no bone gain under HG, highlighting the greater overall response of $BSP^{-/-}$ mice (Table S2). HG did not significantly affect the cortical bone in either genotype (Table S2).

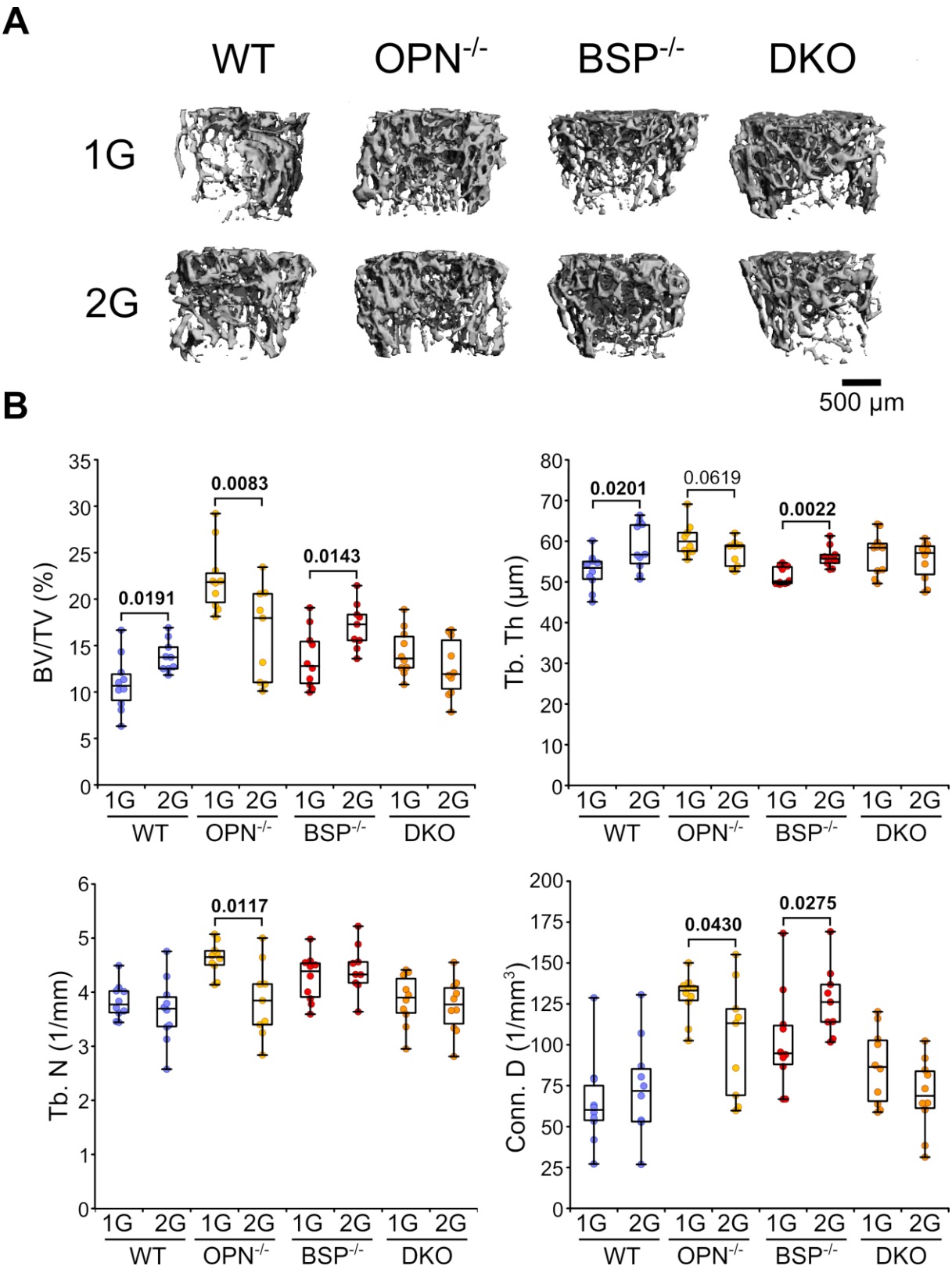


Figure 2: Effect of 2G hyper-gravity on the trabecular network of the femoral distal metaphysis bone of WT, OPN$^{-/-}$, BSP$^{-/-}$ and DKO mice. µCT analysis allowed (A) 3D reconstruction images as well as the measurement of (B) architectural parameters: BV/TV, Tb.Th, Tb.N and Conn.D. The graph gives p-values between 1G and 2G, in **bold** lettering when <0.05, Mann-Whitney *U* test, N = 9-10 mice/group. See also Table S2.

Hyper-gravity effects on bone cellular activities are genotype specific

In WT trabecular bone, HG decreased significantly Oc.S/BS, along with a trend towards higher BFR/BS (Figure 3A, C). Concomitantly, RT-qPCR analysis showed increased OSX, OCN and ALP expression and a trend towards a decrease of TRAcP expression inside the shaft of WT mice at 2G (Figure 3D, Table S3). HG increased trabecular bone remodeling in $OPN^{-/-}$ mice, with higher BFR/BS and Oc.S/BS as well as increased OSX, ALP, OCN and TRAcP expression (Figure 3A, C, D, Table S3). $BSP^{-/-}$ mice showed a specific increase in BFR/BS with no change in Oc.S/BS (Figure 3A, B) with an increase of ERα and a trend towards higher ALP (Figure 3D). DKO mice showed no significant change in bone cellular activity or RNA expression under HG (Figure 3A, D, Table S2, S3). In cortical bone, despite no architectural changes in the 4 genotypes under HG, $OPN^{-/-}$ and $BSP^{-/-}$ mice showed similar gene responses with a drop in OCN, SCLN, DMP1 and MEPE expression (Table S3).

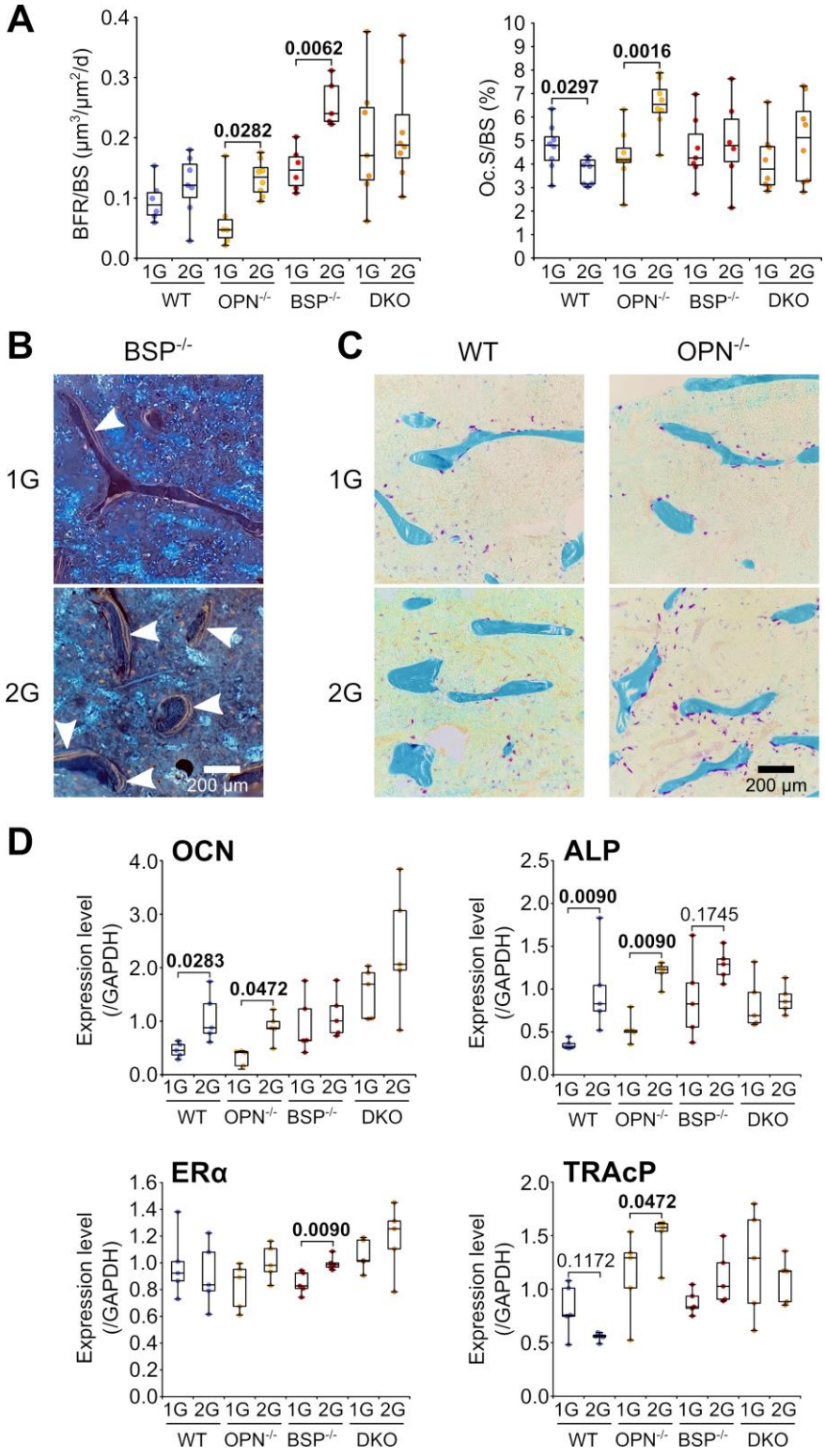


Figure 3: Effect of 2G hyper-gravity on the trabecular cellular dynamics of the femoral distal metaphysis and on the molecular markers in the femoral shaft of WT, OPN$^{-/-}$, BSP$^{-/-}$ and DKO mice. Histomorphometric analysis showed (A) formation activity (BFR/BS) and osteoclast surfaces (Oc.S/BS) at the end-point of the experiment. (B) White arrows indicate trabecular double labeling surfaces in BSP$^{-/-}$ mice from 1G and 2G groups, showing a clear increase under HG. (C) Osteoclast surfaces are counted using TRAcP staining (in red). Under HG, these surfaces decreased in WT mice and increased in OPN$^{-/-}$ mice. qRT-PCR analysis showed (D) RNA expression in the shaft, given as ratio of the housekeeping gene GAPDH. Abbreviations: GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; OCN: osteocalcin; ALP: alkaline phosphatase; ERα: estrogen receptor alpha; TRAcP: tartrate-resistant acid phosphatase. The graph gives p-values between 1G and 2G, in **bold** lettering when <0.05, Mann-Whitney *U* test, N = 5-10 mice/group. See also Tables S2 and S3.

Whole body vibration induces cortical bone loss in OPN$^{-/-}$ mice, in contrast to bone gain in BSP$^{-/-}$ mice

Although the animals displayed wariness during the first vibration sessions, and the DKO and BSP$^{-/-}$ in particular tended to huddle in the middle of the plates, mice from all genotypes roamed around freely under WBV after a few days. The vibration regimen did not affect either the weight curve or the final femur length in all genotypes, although all weight curves were stalled for the first ~2 weeks, suggestive of a general stress likely resulting from repeated manipulation (Figure S2, Table S4). OPN$^{-/-}$ was the only genotype to display an effect of WBV on the trabecular compartment, with a loss of BV/TV in the distal femoral metaphysis (-27%) and L2 vertebra (-18%), associated with increased Oc.S/BS in the femur metaphysis (+72%, Table S4).

In cortical bone, WT and DKO mice showed no structural change under WBV (Figure 4). Vibrated OPN$^{-/-}$ mice displayed significant decrease of Ct.Th, Ct.Ar and Tt.Ar (-9%, -13% and -9% respectively, Figure 4). This was concomitant to a significant reduction of biomechanically relevant parameters such as pMOI (Figure 4B) Imax/Cmax and Imin/Cmin (Table S4). In contrast, BSP$^{-/-}$ mice showed a significant increase in Ct.Th (+7%) under WBV (Figure 4), with a trend towards a decrease of the Ma.Ar/Tt.Ar ratio (p = 0.0607, Table S4) with no change in Tt.Ar (Figure 4), indicative of a narrowing medullary space under WBV.

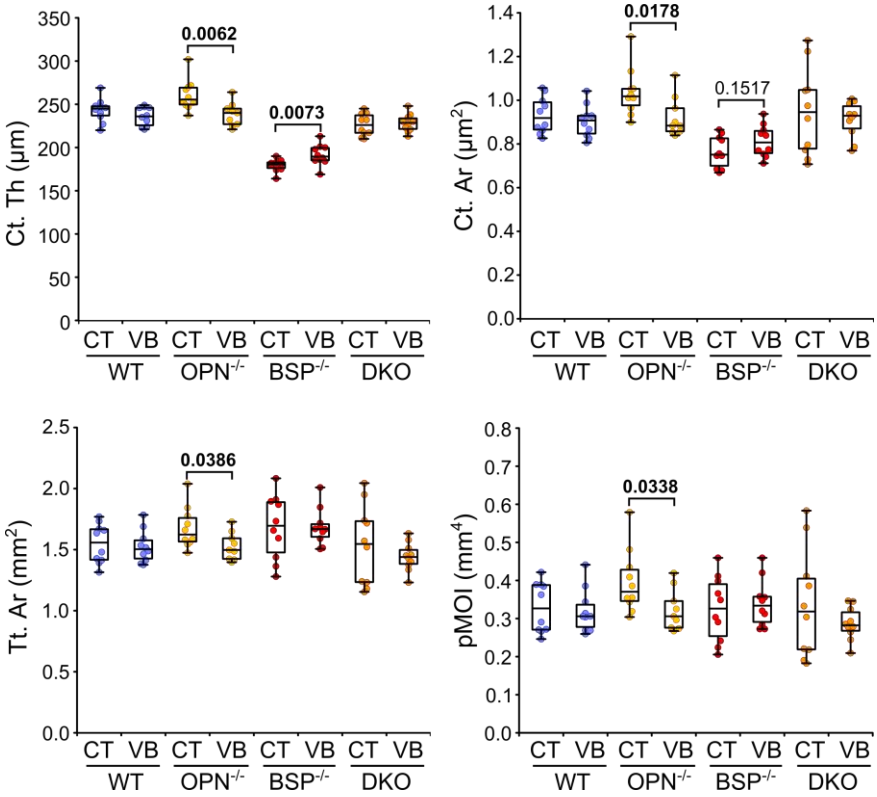


Figure 4: Effect of WBV on the femoral cortical bone of WT, OPN$^{-/-}$, BSP$^{-/-}$ and DKO mice. µCT analysis allowed the measurement of architectural parameters: Ct.Th, Ct.Ar, Tt.Ar and pMOI. The graph gives p-values between CT and VB, in **bold** lettering when <0.05, Mann-Whitney *U* test, N = 9-10 mice/group. See also Table S4.

Whole body vibration induces opposite cellular responses in $OPN^{-/-}$ and $BSP^{-/-}$ cortical bones

WBV did not affect significantly formation and resorption parameters in endocortical and periosteal surfaces of WT and DKO mice, except for a trend towards increased endocortical BFR/BPm in the DKO (Figure 5A), and a similar trend towards increased OCN expression (p = 0.0687, Table S5). Vibrated $OPN^{-/-}$ mice showed a decrease in endocortical formation (Ec. MPm/BPm: -46%; Ec. BFR/BPm: -54%, Figure 5A, 6A,) and periosteal MAR (Ps. MAR: -21%, Figure 5B, 6A) and an increase in endocortical resorption (Ec. Oc.Pm/BPm: +95%, Figure 5A, 6A) along with a trend towards decreased OCN expression (p = 0.0621, Table S5). Vibrated $BSP^{-/-}$ mice increased formation activity both on the endocortical (Ec. MAR: +39%; Ec. BFR/BPm: +40%, Figure 5A, 6A) and periosteal surfaces (Ps. MAR: +20%; Ps. BFR/BPm: +29%, Figure 5B, 6A), concomitant with a decrease in periosteal Oc.Pm/BPm (-68%, Figure 5B, 6A). $BSP^{-/-}$ mice also showed a drop in RANKL, Cathepsin K, and OPN expression under WBV (Figure 7), along with a trend towards reduced SCLN expression (Table S5).

The balance between formation and resorption effects on the periosteal and endosteal surface resulted in uneven thinning of cortical bone in vibrated $OPN^{-/-}$ mice, which was mostly localized in the anterolateral and posterolateral sectors, while cortical thickening in vibrated $BSP^{-/-}$ mice occurred in all sectors except the lateral part (Figure 6B).

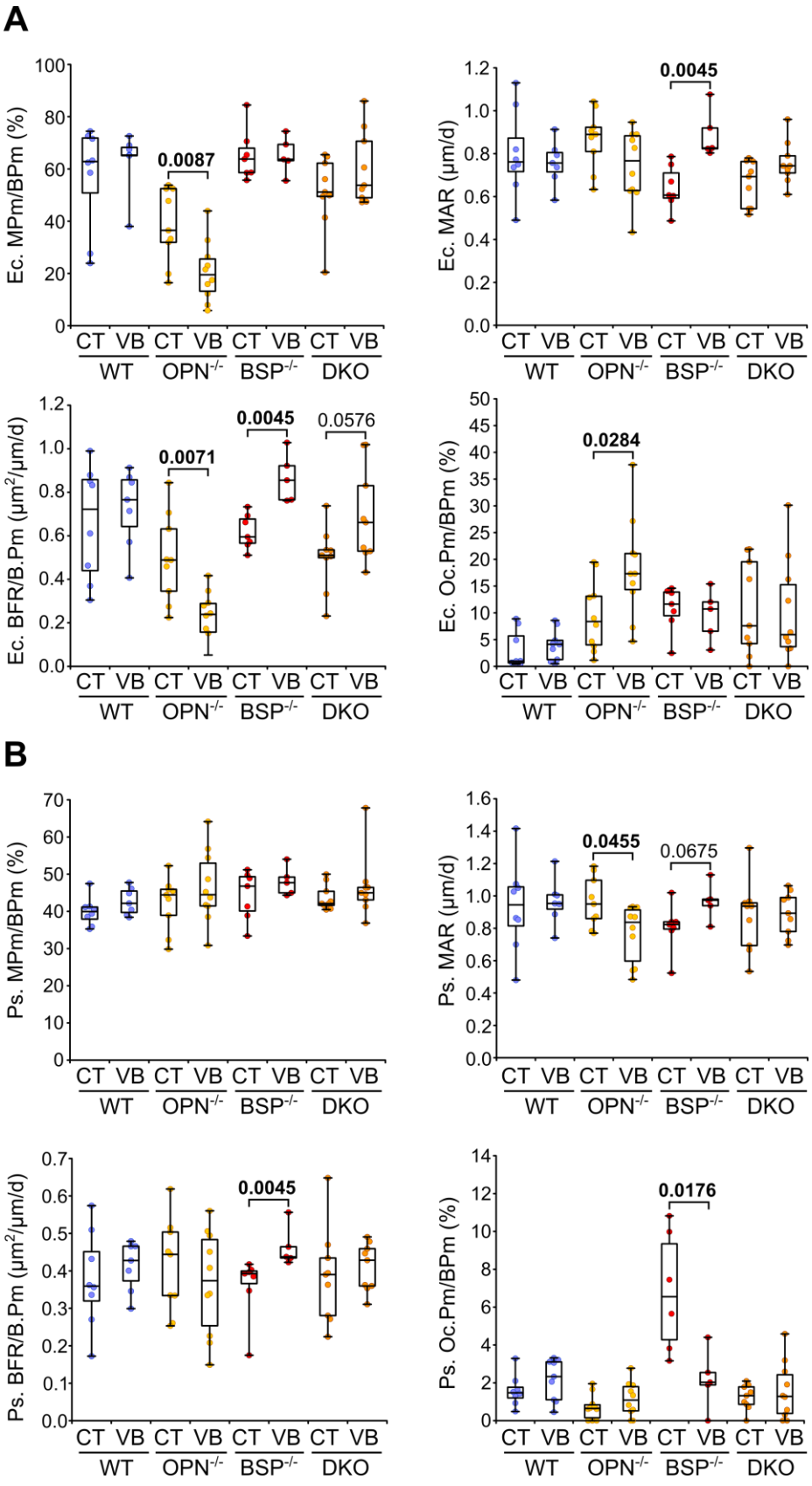


Figure 5: Effect of WBV on the cortical cellular dynamics of the femur of WT, OPN$^{-/-}$, BSP$^{-/-}$ and DKO mice. Histomorphometric analysis showed (A) endocortical and (B) persioteal MPm/BPm (mineralized perimeter per bone perimeter), MAR (mineral apposition rate), BFR/BPm (bone formation rate per bone perimeter) and Oc.Pm/BPm (osteoclast perimeter per bone perimeter). The graph gives p-values between CT and VB, in **bold** lettering when <0.05, Mann-Whitney *U* test, N = 5-10 mice/group. See also Table S4.

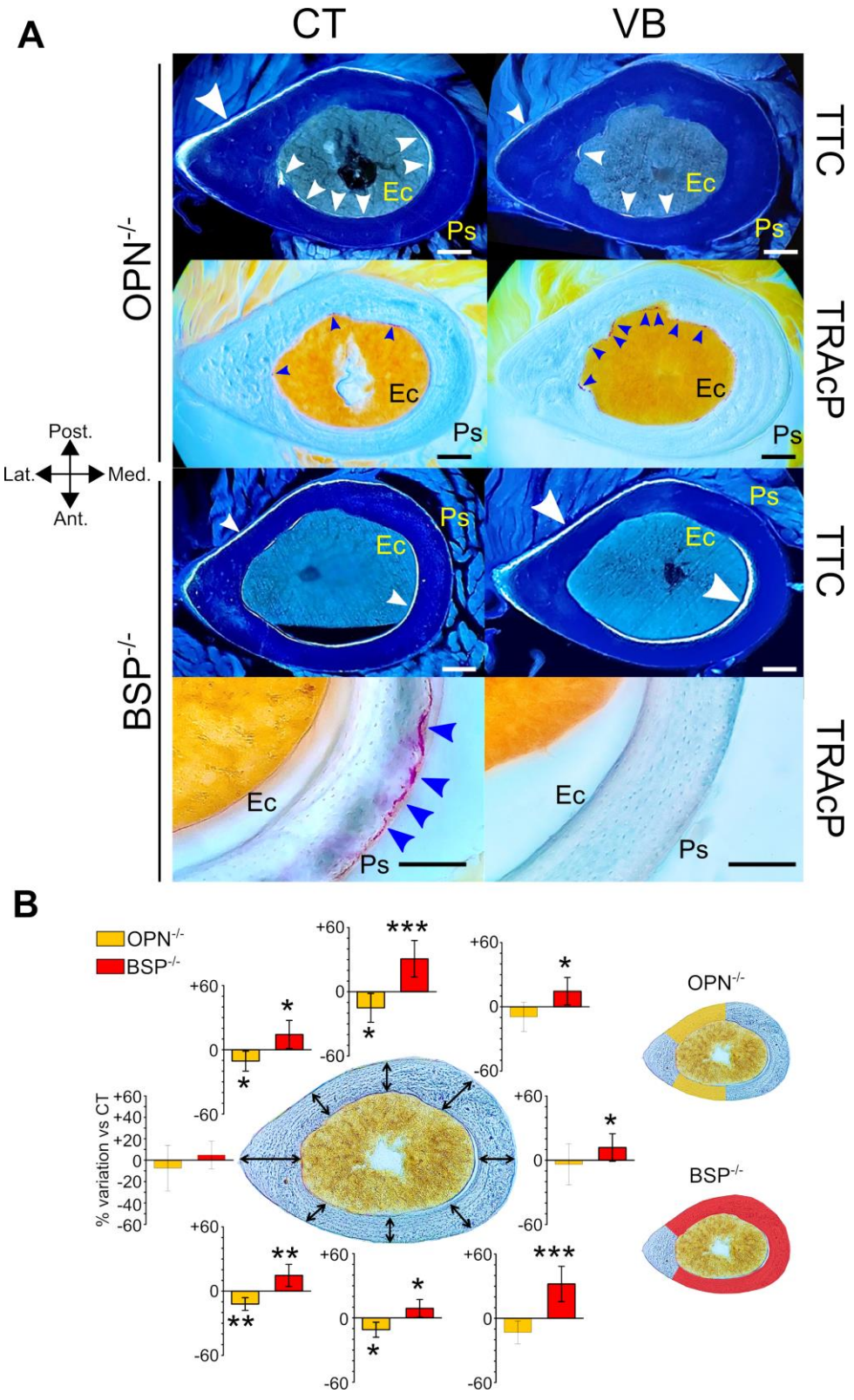


Figure 6: Site targeted effect of WBV on WT, OPN$^{-/-}$, BSP$^{-/-}$ and DKO cortical bone. (A) Tetracycline labeling and TRAcP staining of osteoclasts in OPN$^{-/-}$ and BSP$^{-/-}$ cortical sections from CT and VB groups; bar = 250 µm; white arrows: formation surfaces, blue arrows: osteoclast surfaces. Abbreviations: TTC: tetracycline; TRAcP: tartrate-resistant acid phosphatase; Ec: endocortical surface; Ps: periosteal surface. (B) Effect of WBV regime on local femoral cortical bone thickness of OPN$^{-/-}$ and BSP$^{-/-}$ mice. The graphs show the percent variation of VB vs CT in each sector (mean+/-SD), for OPN$^{-/-}$ (yellow bars) and BSP$^{-/-}$ mice (red bars). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ vs CT, Fisher's *t*-test, N = 9-10 mice/group. The schematic on the right summarize the targeted effects of WBV on OPN$^{-/-}$ (loss in yellow areas) and BSP$^{-/-}$ cortical bone (gain in red areas).

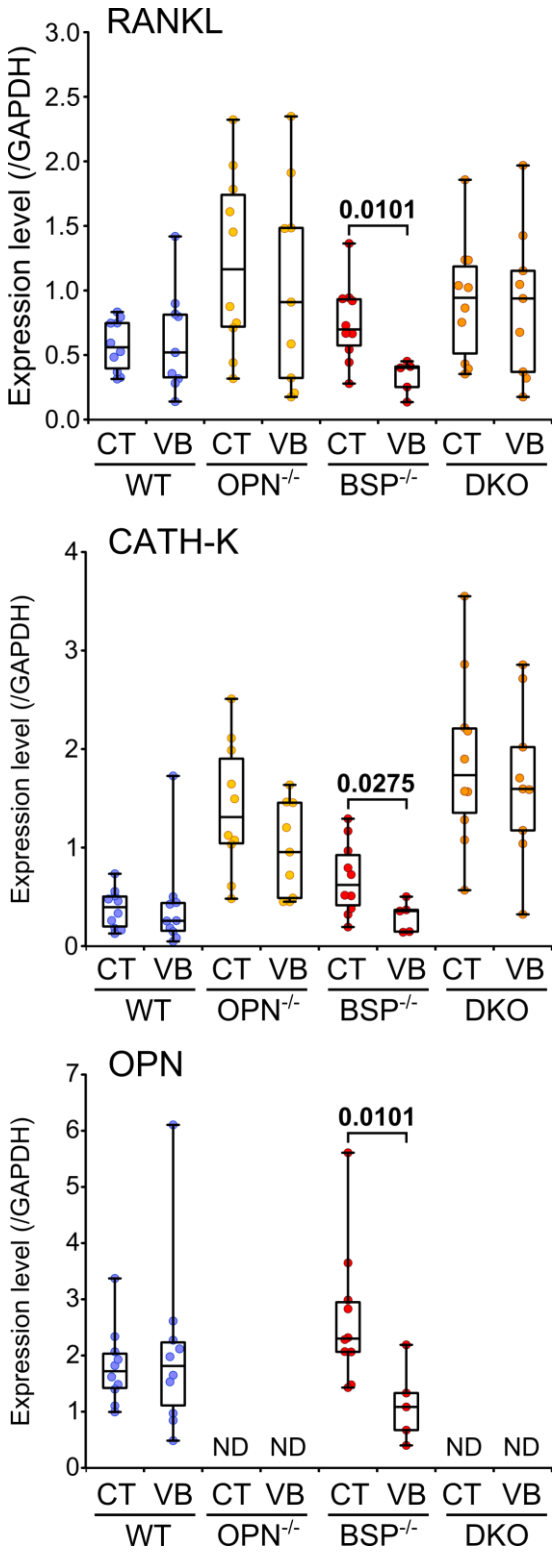


Figure 7: Effect of WBV on mRNA expression in femur cortical bone of WT, OPN$^{-/-}$, BSP$^{-/-}$ and DKO mice, given as ratio to GAPDH. Abbreviations: GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; RANKL: receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; OPN: osteopontin; CATH-K: cathepsin K. The graph gives p-values between CT and VB, in **bold** lettering when <0.05, Mann-Whitney *U* test, N = 5-10 mice/group. ND = not detected. See also Table S5.

Discussion

Although the rapid increase in gene expression of OPN and BSP under mechanical stimulation has been amply documented (16–19), no study to date has assessed the effect of their absence on the response of bone to increased mechanical signals in an *in vivo* model. To our knowledge, only one *in vitro* study previously reported that primary bone cells cultured from fragments of $OPN^{-/-}$ long bones displayed a deficit of nitric oxide (NO) production under pulsatile fluid flow (29). Moreover, due to the complex functional interactions between OPN and BSP that we have highlighted in previous studies (23–25), the DKO model is important here to assess the interplay between OPN and BSP under mechanical challenge. The present study shows that the single extinction of OPN or BSP affects the response of bone to mechanical stimulation in opposite ways, while their concomitant absence results in no structural effects. These findings were made in two different mechanical stress models, HG which mainly affects trabecular bone (3), and WBV which mainly targets cortical bone (10).

Our group previously reported an increase of trabecular BV/TV under HG in C57Bl/6 mice, associated with a drop of osteoclast surfaces (3). We confirm these results here on 129sv/CD1 outbred mice. This contrasts with the response of $OPN^{-/-}$ mice which show a drop in trabecular BV/TV with increased osteoclast surfaces. $OPN^{-/-}$ was the only genotype to increase osteoclast surfaces under mechanical stress in all the bone compartments investigated by histomorphometry (in the trabecular network under both regimen and in the cortical bone under WBV). $OPN^{-/-}$ mice have been shown to be resistant to bone loss induced by hindlimb unloading (tail suspension) or ovariectomy, in part due to impaired stimulation of osteoclast activity (30–32). Our results indicate that the defect in $OPN^{-/-}$ osteoclast sensitivity mice is rescued by mechanical stress. That $OPN^{-/-}$ mice also display a decrease of bone formation parameters in the cortical compartment under WBV indicates that the mutation also affects the osteoblast response, at least to this type of mechanical signal.

Under WBV, $OPN^{-/-}$ mice display a higher loss of cortical thickness on the posterolateral and anterolateral segments, likely due to increased endocortical resorption and decreased endocortical formation, respectively. Since pMOI represents the distribution of bone mass around an axis (33), the significant decrease of this parameter in $OPN^{-/-}$ mice under WBV could be explained by this localized effect which altered the distribution of cortical bone mass. In addition, $OPN^{-/-}$ mice also showed a drop in cortical Tt.Ar and Ct.Ar which also impacts pMOI. Overall, these results suggest a mechanoprotective function for OPN in bone. Interestingly, such a role has been described through *in vivo* and *in vitro* models in the kidney where OPN protects against the deleterious mechanical effects of glomerular hypertension on podocytes through its attachment to the αV integrin (34,35). A similar cellular mechanism remains to be investigated in bone.

In $BSP^{-/-}$ mice, cellular responses indicate that bone gain under mechanical stimulation occurs primarily through increased formation. Under HG, $BSP^{-/-}$ mice increased their trabecular BFR/BS, and molecular data showed a trend towards higher ALP as well as higher ERα expression in shaft flushes,

which sample the endosteal surfaces. ERα role in mechanotransduction has been described as pro-osteogenic (36–40). It has also been shown that ERα is involved in the induction of osteoblastic maturation, through an estradiol-dependent signaling pathway, by upregulating mitochondrial cytochrome c oxidase (COX) 1 mRNA and more globally by improving cellular ATP synthesis (36,39,41–43). Surprisingly, $BSP^{-/-}$ mice under WBV, in addition to their increased global BFR/BPm in cortical bone, also decreased their periosteal resorption activity, which at baseline (in $BSP^{-/-}$ CT) is the highest of all 4 genotypes. This correlated with decreased cortical expression of RANKL, CathK and OPN. We have previously shown that in contrast to WT, the femoral cortical thickness of $BSP^{-/-}$ mice is not increased under intermittent PTH administration, which resulted in higher RANKL and OPN expression (44). WBV is indeed the only known experimental challenge to increase Ct.Th in $BSP^{-/-}$ mice, hinting at a specific role of BSP in the skeletal response to mechanical stimuli.

Overall, our data suggest that in the absence of BSP, OPN expression is required for the anabolic skeletal response to mechanical signals. Conversely, in the absence of OPN, bone loss might be dependent on BSP expression. However, because of the overexpression of OPN in the bones of 2 months old $BSP^{-/-}$ mice (25) and the variations of its expression in challenged $BSP^{-/-}$ bone, all indicative of cross-regulation, the apparent insensitivity of DKO mice to either mechanical challenge cannot be interpreted as a simple “canceling effect” of the double extinction. Clearly, the interactions between OPN and BSP appear to be a key element in the skeletal response to mechanical stress. More work will be needed to identify the specific cellular and molecular mechanisms of this cross-talk. In particular, a fine temporal analysis of the cortical response will be required to detail and quantify the kinetics of the anabolic or catabolic effects (or the lack thereof) observed under WBV, but also the impact on osteocytes in all genotypes including the DKO.

In summary, under two different mechanical stress protocols, targeting distinct bone compartments, $BSP^{-/-}$ mice gained bone mass while $OPN^{-/-}$ mice lost bone. $BSP^{-/-}$ bones decreased OPN expression under mechanical stress, while BSP regulation in $OPN^{-/-}$ mice was challenge- and site-specific. Absence of both proteins (DKO) leads to insensitivity to mechanical stress, at least in terms of final outcome and with the challenges used in this work. These results suggest that interplay between OPN and BSP is a key element of skeletal adaptation to mechanical stimulation.

Acknowledgements

The authors thank the team of PLEXAN for skilful technical assistance, Dr Myriam Normand (U1059, LBTO) for advice on statistics and Elisa Dalix (U1059, LBTO) for technical assistance for qPCR experiments.

Funding: The "Agence Nationale de la Recherche" (grants ANR-13-BSV1-0010-01 "Mouse_Kosto" to LM), the "Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale" (INSERM), the "Université Jean-

Monnet" of Saint Etienne and the « Ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation » for PhD scholarship for MM.

Disclosure: The authors have nothing to disclose.

References

1. Iwaniec UT, Turner RT. Influence of body weight on bone mass, architecture and turnover. J Endocrinol. 2016 Sep 1;230(3):R115–30.
2. Vico L, Hargens A. Skeletal changes during and after spaceflight. Nat Rev Rheumatol. 2018 Apr;14(4):229–45.
3. Gnyubkin V, Guignandon A, Laroche N, Vanden-Bossche A, Normand M, Lafage-Proust M-H, et al. Effects of chronic hypergravity: from adaptive to deleterious responses in growing mouse skeleton. J Appl Physiol. 2015 Oct 15;119(8):908–17.
4. Argyrou C, Lambrou G. Hypergravity and its effects on bones and the musculoskeletal system: a narrative review. J Res Pract Musculoskelet Syst. 2019 Mar 1;1–4.
5. Tominari T, Ichimaru R, Taniguchi K, Yumoto A, Shirakawa M, Matsumoto C, et al. Hypergravity and microgravity exhibited reversal effects on the bone and muscle mass in mice. Sci Rep. 2019 Apr 29;9(1):6614.
6. Karlsson MK, Rosengren BE. Exercise and Peak Bone Mass. Curr Osteoporos Rep. 2020 Jun 1;18(3):285–90.
7. Cauley JA, Giangregorio L. Physical activity and skeletal health in adults. Lancet Diabetes Endocrinol. 2020 Feb 1;8(2):150–62.
8. Swolin-Eide D, Magnusson P. Does Whole-Body Vibration Treatment Make Children's Bones Stronger? Curr Osteoporos Rep. 2020 Oct 1;18(5):471–9.
9. Sen EI, Esmaeilzadeh S, Eskiyurt N. Effects of whole-body vibration and high impact exercises on the bone metabolism and functional mobility in postmenopausal women. J Bone Miner Metab. 2020 May 1;38(3):392–404.
10. Gnyubkin V, Guignandon A, Laroche N, Vanden-Bossche A, Malaval L, Vico L. High-acceleration whole body vibration stimulates cortical bone accrual and increases bone mineral content in growing mice. J Biomech. 2016 Jun 14;49(9):1899–908.
11. Pasqualini M, Lavet C, Elbadaoui M, Vanden-Bossche A, Laroche N, Gnyubkin V, et al. Skeletal site-specific effects of whole body vibration in mature rats: From deleterious to beneficial frequency-dependent effects. Bone. 2013 Jul 1;55(1):69–77.
12. Christiansen BA, Silva MJ. The Effect of Varying Magnitudes of Whole-Body Vibration on Several Skeletal Sites in Mice. Ann Biomed Eng. 2006 Jul 1;34(7):1149–56.
13. Wenger KH, Freeman JD, Fulzele S, Immel DM, Powell BD, Molitor P, et al. Effect of whole-body vibration on bone properties in aging mice. Bone. 2010 Oct 1;47(4):746–55.
14. Department of Orthopaedics and Traumatology, Prince of Wales Hospital, The Chinese University of Hong Kong, Shatin, New Territories, Hong Kong SAR, China, Wang J, Leung K, Chow S, Cheung W. The effect of whole body vibration on fracture healing – a systematic review. Eur Cell Mater. 2017 Sep 7;34:108–27.
15. Judex S, Lei X, Han D, Rubin C. Low-magnitude mechanical signals that stimulate bone formation in the ovariectomized rat are dependent on the applied frequency but not on the strain magnitude. J Biomech. 2007 Jan 1;40(6):1333–9.
16. Yu H, Ren Y, Sandham A, Ren A, Huang L, Bai D. Mechanical Tensile Stress Effects on the Expression of Bone Sialoprotein in Bovine Cementoblasts. Angle Orthod. 2009 Mar 1;79(2):346–52.

17. Morinobu M, Ishijima M, Rittling SR, Tsuji K, Yamamoto H, Nifuji A, et al. Osteopontin Expression in Osteoblasts and Osteocytes During Bone Formation Under Mechanical Stress in the Calvarial Suture In Vivo. J Bone Miner Res. 2003;18(9):1706–15.
18. Zhou S, Zu Y, Sun Z, Zhuang F, Yang C. Effects of Hypergravity on Osteopontin Expression in Osteoblasts. PLOS ONE. 2015 Jun 5;10(6):e0128846.
19. Kreke MR, Huckle WR, Goldstein AS. Fluid flow stimulates expression of osteopontin and bone sialoprotein by bone marrow stromal cells in a temporally dependent manner. Bone. 2005 Jun 1;36(6):1047–55.
20. Fisher LW, Fedarko NS. Six Genes Expressed in Bones and Teeth Encode the Current Members of the SIBLING Family of Proteins. Connect Tissue Res. 2003 Jan;44(1):33–40.
21. Staines KA, MacRae VE, Farquharson C. The importance of the SIBLING family of proteins on skeletal mineralisation and bone remodelling. J Endocrinol. 2012 Sep 1;214(3):241–55.
22. Malaval L, Wade-Guéye NM, Boudiffa M, Fei J, Zirngibl R, Chen F, et al. Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis. J Exp Med. 2008 May 12;205(5):1145–53.
23. Bouleftour W, Juignet L, Verdière L, Machuca-Gayet I, Thomas M, Laroche N, et al. Deletion of OPN in BSP knockout mice does not correct bone hypomineralization but results in high bone turnover. Bone. 2019 Mar;120:411–22.
24. Bouleftour W, Bouet G, Granito RN, Thomas M, Linossier M-T, Vanden-Bossche A, et al. Blocking the Expression of Both Bone Sialoprotein (BSP) and Osteopontin (OPN) Impairs the Anabolic Action of PTH in Mouse Calvaria Bone: EITHER BSP OR OPN IS REQUIRED FOR PTH ACTION. J Cell Physiol. 2015 Mar;230(3):568–77.
25. Granito R neves, Bouleftour W, Sabido O, Lescale C, Thomas M, Aubin JE, et al. Absence of Bone Sialoprotein (BSP) Alters Profoundly Hematopoiesis and Upregulates Osteopontin: LACK OF BSP ALTERS BONE MARROW COMPOSITION. J Cell Physiol. 2015 Jun;230(6):1342–51.
26. Bouleftour W, Boudiffa M, Wade-Gueye NM, Bouët G, Cardelli M, Laroche N, et al. Skeletal Development of Mice Lacking Bone Sialoprotein (BSP) - Impairment of Long Bone Growth and Progressive Establishment of High Trabecular Bone Mass. Vanacker J-M, editor. PLoS ONE. 2014 May 9;9(5):e95144.
27. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro–computed tomography. J Bone Miner Res. 2010;25(7):1468–86.
28. Bouleftour W, Juignet L, Bouet G, Granito RN, Vanden-Bossche A, Laroche N, et al. The role of the SIBLING, Bone Sialoprotein in skeletal biology — Contribution of mouse experimental genetics. Matrix Biol. 2016 May;52–54:60–77.
29. Denhardt DT, Burger EH, Kazanecki C, Krishna S, Semeins CM, Klein-Nulend J. Osteopontin-Deficient Bone Cells Are Defective in Their Ability to Produce NO in Response to Pulsatile Fluid Flow. Biochem Biophys Res Commun. 2001 Oct 26;288(2):448–53.
30. Ishijima M, Rittling SR, Yamashita T, Tsuji K, Kurosawa H, Nifuji A, et al. Enhancement of Osteoclastic Bone Resorption and Suppression of Osteoblastic Bone Formation in Response to Reduced Mechanical Stress Do Not Occur in the Absence of Osteopontin. J Exp Med. 2001 Feb 5;193(3):399–404.
31. Yoshitake H, Rittling SR, Denhardt DT, Noda M. Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Jul 6;96(14):8156–60.
32. Ishijima M, Tsuji K, Rittling SR, Yamashita T, Kurosawa H, Denhardt DT, et al. Resistance to Unloading-Induced Three-Dimensional Bone Loss in Osteopontin-Deficient Mice. J Bone Miner Res. 2002;17(4):661–7.

33. Jepsen KJ, Silva MJ, Vashishth D, Guo XE, Meulen MC van der. Establishing Biomechanical Mechanisms in Mouse Models: Practical Guidelines for Systematically Evaluating Phenotypic Changes in the Diaphyses of Long Bones. J Bone Miner Res. 2015;30(6):951–66.
34. Schordan S, Schordan E, Endlich K, Endlich N. αV-Integrins mediate the mechanoprotective action of osteopontin in podocytes. Am J Physiol-Ren Physiol. 2011 Jan 1;300(1):F119–32.
35. Endlich N, Sunohara M, Nietfeld W, Wolski EW, Schiwek D, Kränzlin B, et al. Analysis of differential gene expression in stretched podocytes: osteopontin enhances adaptation of podocytes to mechanical stress. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol. 2002 Nov;16(13):1850–2.
36. Wu G-J, Chen J-T, Lin P-I, Cherng Y-G, Yang S-T, Chen R-M. Inhibition of the estrogen receptor alpha signaling delays bone regeneration and alters osteoblast maturation, energy metabolism, and angiogenesis. Life Sci. 2020 Oct 1;258:118195.
37. Saxon LK, Galea G, Meakin L, Price J, Lanyon LE. Estrogen Receptors α and β Have Different Gender-Dependent Effects on the Adaptive Responses to Load Bearing in Cancellous and Cortical Bone. Endocrinology. 2012 May 1;153(5):2254–66.
38. Haffner-Luntzer M, Kovtun A, Lackner I, Mödinger Y, Hacker S, Liedert A, et al. Estrogen receptor α- (ERα), but not ERβ-signaling, is crucially involved in mechanostimulation of bone fracture healing by whole-body vibration. Bone. 2018 May 1;110:11–20.
39. Khalid AB, Krum SA. Estrogen receptors alpha and beta in bone. Bone. 2016 Jun 1;87:130–5.
40. Zaman G, Jessop HL, Muzylak M, Souza RLD, Pitsillides AA, Price JS, et al. Osteocytes Use Estrogen Receptor α to Respond to Strain but Their ERα Content Is Regulated by Estrogen. J Bone Miner Res. 2006;21(8):1297–306.
41. Wu G-J, Chen J-T, Cherng Y-G, Chang C-C, Liu S-H, Chen R-M. Genistein Improves Bone Healing via Triggering Estrogen Receptor Alpha-Mediated Expressions of Osteogenesis-Associated Genes and Consequent Maturation of Osteoblasts. J Agric Food Chem. 2020 Sep 30;68(39):10639–50.
42. Almeida M, Iyer S, Martin-Millan M, Bartell SM, Han L, Ambrogini E, et al. Estrogen receptor-α signaling in osteoblast progenitors stimulates cortical bone accrual. J Clin Invest. 2013 Jan 2;123(1):394–404.
43. Galea GL, Meakin LB, Sugiyama T, Zebda N, Sunters A, Taipaleenmaki H, et al. Estrogen Receptor α Mediates Proliferation of Osteoblastic Cells Stimulated by Estrogen and Mechanical Strain, but Their Acute Down-regulation of the Wnt Antagonist Sost Is Mediated by Estrogen Receptor β *. J Biol Chem. 2013 Mar 29;288(13):9035–48.
44. Wade-Gueye NM, Boudiffa M, Laroche N, Vanden-Bossche A, Fournier C, Aubin JE, et al. Mice Lacking Bone Sialoprotein (BSP) Lose Bone after Ovariectomy and Display Skeletal Site-Specific Response to Intermittent PTH Treatment. Endocrinology. 2010 Nov;151(11):5103–13.

Supplementary Material

Figure S1: Weight curves of WT, OPN$^{-/-}$, BSP$^{-/-}$ and DKO mice kept at 1G (Controls) and 2G for 21 days.
Figure S2: Weight curves of WT, OPN$^{-/-}$, BSP$^{-/-}$ and DKO mice submitted to WBV (VB) or not (CT) 15 minutes/day, 6 days/week for 42 days.

Table S1: PCR primer sequences.
Table S2: Effects of hyper-gravity on architectural and dynamic bone parameters.
Table S3: Effects of hyper-gravity on gene expression in trabecular and cortical tibia.
Table S4: Effects of whole body vibration on architectural and dynamic bone parameters.
Table S5: Effects of whole body vibration on gene expression in cortical tibia.

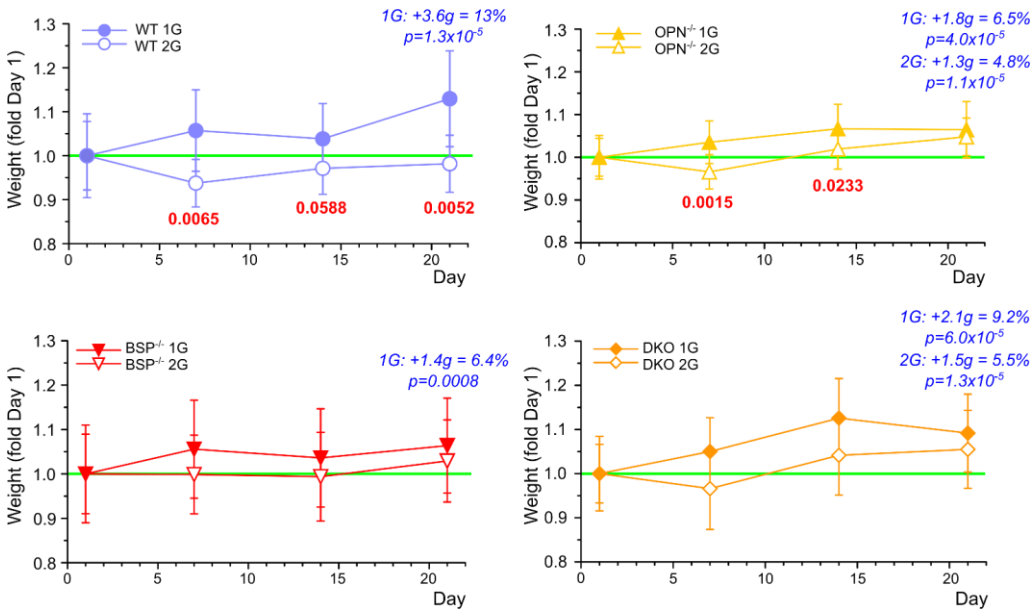


Figure S1: Weight curves of WT, OPN$^{-/-}$, BSP$^{-/-}$ and DKO mice kept at 1G (Controls) and 2G for 21 days. Mice were weighted at day (D)1, 7, 14 and 21 of the experiment. Data for each group are mean±SD, expressed as a ratio to the value at D1 (fold Day1). In red **bold**, p for day-matched 2G vs 1G, Mann-Whitney U test; in blue *italics*, weight gain at D21, in grams (g) and % of D1, and *p* for G-matched D21 vs D1, paired *t* test. N=10 mice/group.

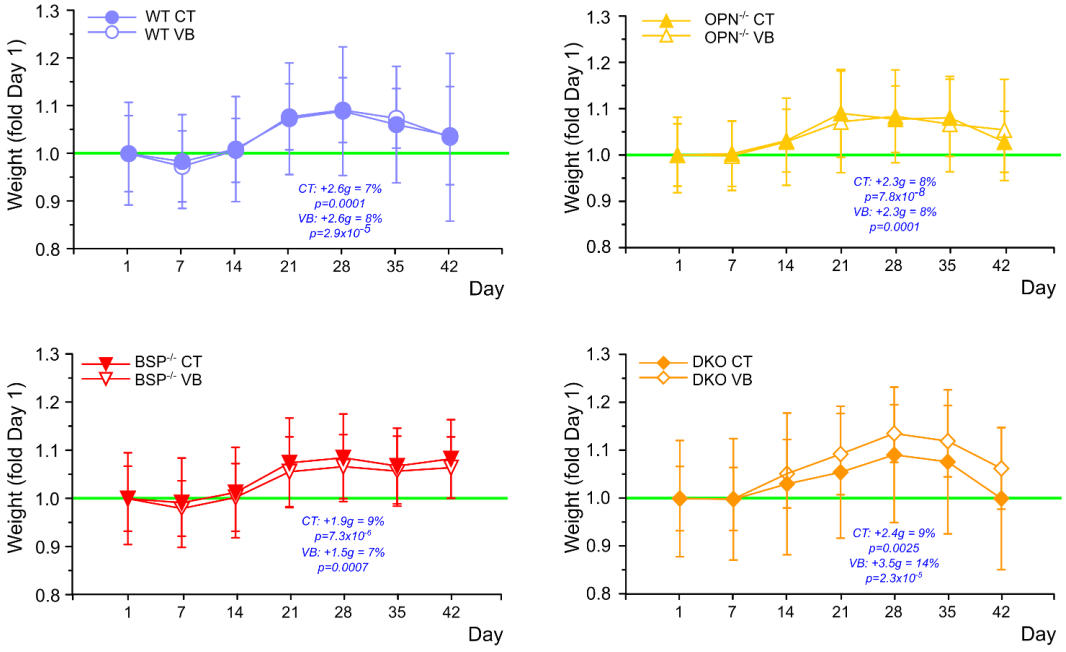


Figure S2: Weight curves of WT, OPN$^{-/-}$, BSP$^{-/-}$ and DKO mice submitted to WBV (VB) or not (CT) 15 minutes/day, 6 days/week for 42 days. Mice were weighted at day (D)1, 7, 14, 21, 28, 35 and 42 of the experiment. Data for each group are mean±SD, expressed as a ratio to the value at D1 (fold Day1). In blue *italics*, weight gain at D28, in grams (g) and % of D1, and *p* for condition-matched D28 vs D1, paired *t* test. N=10 mice/group.

Table S1: PCR primer sequences.

Protein	***Forward***	***Reverse***	***Gene Bank ID***
OPN	cccggtgaaagtgactgattc	atggctttcattggaattgc	NM_001204201.1
BSP	acaatccgtgccactcactc	ggaactatcgccgtctccat	NM_008318.3
DMP1	ccacgaacagtgagtcatc	tactggcctctgtcgtagc	NM_001359013.1
MEPE	aggctgtgtctgttggactg	ccatcctctgtgccttcatc	NM_053172.2
OSX	atggcgtcctctctgcttg	aaggtcagcgtatggcttct	NM_130458.3
ERα	gctactgtgccgtgtgcaat	cctccggttcttgtcaatgg	NM_010516
ALP	agttactggcgacagcaagc	ggacctgagcgttggtgtta	NM_007431.2
OCN	ctctgacctcacagatgccaa	ctggtctgatagctcgtcaca	NM_001032298.3
SCLN	tcctcctgagaacaaccagac	tgtcaggaagcgggtgtagtg	NM_024449.5
POSTN	attaggcttggcatcctctc	agatagccgtccgatacaca	NM_015784.2
RANKL	agcatcgctctgttcctgta	ccatgagccttccatcatag	NM_011613.3
CATH-K	tgaccactgccttccaatac	tgccgtggcgttatacatac	NM_007802.4
TRAcP	ggcaacgtctctgcacagat	ttgagccaggacagctgagt	NM_001102405.1
GAPDH	aaggtcggtgtgaacggatt	attctcggccttgactgtgc	NM_008084

Abbreviations: OPN: osteopontin; BSP: bone sialoprotein; DMP1: dentin matrix protein 1; MEPE: matrix extracellular phosphoglycoprotein; OSX: osterix; ERα: estrogen receptor alpha; ALP: alkaline phosphatase; OCN: osteocalcin; SCLN: sclerostin; POSTN: periostin; RANKL: receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; CATH-K: cathepsin K; TRAcP: tartrate-resistant acid phosphatase ; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (housekeeping gene).

Table S2: Effects of hyper-gravity on architectural and dynamic bone parameters.

Bone	*Compartments*	*Parameters*	*Genotypes*							
			WT		*OPN$^{-/-}$*		*BSP$^{-/-}$*		*DKO*	
			1G	*2G*	*1G*	*2G*	*1G*	*2G*	*1G*	*2G*
Vertebra	***Trabecular bone***	BV/TV (%)	13.1±1.5	13.7±2.7	**22.4±3.0*** **	**19.1±2.5$^{\#}$**	**23.2±2.6*** **	**27.5±2.8$^{\#\#}$**	**25.3±4.3*** **	25.1±4.0
		Tb.Th (µm)	45±2	47±2	**52±2*** **	51±2	**52±2*** **	**55±3$^{\#\#}$**	**52±4*** **	53±3
		Tb.N (1/mm)	3.8±0.2	3.7±0.4	**4.5±0.2*** **	4.4±0.3	**4.5±0.2*** **	**4.7±0.1$^{\#}$**	**4.8±0.4*** **	4.6±0.4
		Tb.Sp (µm)	264±16	271±26	**218±12*** **	226±17	**217±12*** **	**206±11$^{\#}$**	**202±19*** **	209±16
		Conn. D (1/mm^3)	107±17	110±34	**158±14*** **	159±26	**173±21*** **	179±17	**189±23*** **	174±25
		SMI	1.9±0.2	1.7±0.2	**1.1±0.2*** **	**1.4±0.2$^{\#}$**	**1.0±0.2*** **	**0.7±0.3$^{\#\#}$**	**1.2±0.3*** **	1.2±0.4
	Whole bone	Length	15.5±0.4	15.6±0.2	15.6±0.3	15.6±0.2	**14.7±0.6** **	14.3±0.3	15.2±0.5	15.1±0.5
Femur	***Trabecular bone***	BV/TV (%)	10.9±3.0	**13.9±1.7$^{\#}$**	**22.2±3.6*** **	**16.3±5.0$^{\#\#}$**	13.5±3.2	**17.1±2.5$^{\#}$**	**14.3±2.5***	12.6±3.1
		Tb.Th (µm)	52.6±4.4	**58.5±5.8$^{\#}$**	**60.4±40.0** **	57.0±3.3	51.4±2.2	**56.1±2.7$^{\#\#}$**	56.9±5.2	55.2±4.8
		Tb.N (1/mm)	3.8±0.33	3.7±0.61	**4.6±0.30*** **	**3.9±0.70$^{\#}$**	**4.3±0.4***	4.4±0.5	3.9±0.5	3.7±0.5
		Tb.Sp (µm)	259±23	278±52	**213±17*** **	**267±54$^{\#}$**	**232±28***	224±25	262±39	270±43
		Conn. D (1/mm3)	65±27	73±30	**129±14*** **	**103±35$^{\#}$**	**103±31*** **	127±21	**87±23** **	69±22
		SMI	2.6±0.3	**2.3±0.3$^{\#}$**	**1.5±0.4*** **	**2.0±0.4$^{\#}$**	**2.3±0.3***	**2.0±0.2$^{\#}$**	**2.1±0.2** **	2.4±0.3
		MS/BS (%)	9.35±3.02	10.86±4.53	**5.68±3.72***	**11.14±1.74$^{\#}$**	**14.0±3.1***	**20.4±2.9$^{\#}$**	13.8±6.1	15.5±5.3
		MAR (µm/d)	1.01±0.11	1.10±0.14	1.05±0.19	1.19±0.12	1.06±0.11	**1.26±0.08$^{\#}$**	**1.42±0.24** **	1.36±0.19
		BFR/BS (µm^3/µm^2/d)	0.09±0.03	0.12±0.05	0.06±0.05	**0.13±0.03$^{\#}$**	**0.15±0.04***	**0.26±0.04$^{\#\#}$**	**0.19±0.11***	0.21±0.09
		Oc.S/BS (%)	4.7±10.0	**3.7±0.6$^{\#}$**	4.3±1.2	**6.5±1.1$^{\#\#}$**	4.6±1.4	4.9±1.9	4.1±1.3	5.0±1.9
		N.Oc/B.Pm (/µm)	6.0±0.9	**4.7±0.5$^{\#\#}$**	6.6±1.7	**9.4±1.7$^{\#\#}$**	7.0±2.0	6.6±2.4	**4.3±0.8** **	6.1±2.4
		Oc.Le (µm)	16.8±2.0	16.8±0.9	**14.0±1.7***	14.9±1.4	**14.2±0.9***	14.3±1.4	18.5±1.2	17.8±3.2
	Cortical bone	Ct.Th (µm)	224±13	232±11	**251±12** **	250±12	**187±7*** **	184±12	233±18	224±12
		Ct.Ar (mm^2)	0.83±0.04	0.86±0.06	**0.95±0.07*** **	0.94±0.09	**0.74±0.05** **	0.72±0.06	**0.92±0.09***	0.90±0.11
		Ct.Po (%)	2.3±0.2	2.2±0.20	2.2±0.2	2.1±0.2	**2.9±0.2*** **	3.0±0.3	**3.2±1.4***	3.2±0.8
		TMD (mg HAP/cm^3)	1309±13	1300±15	1320±16	1308±23	**1269±29** **	1262±17	**1274±21** **	1255±10

1G: control mice; 2G: mice centrifuged at 2G for 3 weeks (see Methods). Abbreviations: BV/TV: bone volume/tissue volume; Tb.Th: trabecular thickness; Tb.N: trabecular number; Tb.Sp: trabecular separation; Conn.D: connection density; SMI: structure model index; MS/BS: mineralized surface/bone surface; MAR: mineral apposition rate; BFR/BS: bone formation rate/bone surface; Oc.S/BS: osteoclast surface/bone surface; N.Oc/BS: number of osteoclasts/bone surface; Oc.Le: osteoclast length; Ct.Th: cortical thickness; Ct.Ar: cortical area; Ct.Po: cortical porosity; TMD: tissue mineral density. Values are Mean±SD of 5-10 mice/group, in **bold** when p<0.05. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ vs WT 1G; $^{\#}$: $p < 0.05$, $^{\#\#}$: $p < 0.01$ vs genotype-matched 1G; Mann-Whitney *U* test.

Table S3: ***Effects of hyper-gravity on gene expression in trabecular and cortical tibia.***

Compartments	*Genes*	*Genotypes*							
		WT		*OPN$^{-/-}$*		*BSP$^{-/-}$*		*DKO*	
		1G	*2G*	*1G*	*2G*	*1G*	*2G*	*1G*	*2G*
Shaft (Comprising trabecular bone)	OCN	0.46±0.14	**1.07±0.46$^{\#}$**	0.31±0.16	**0.89±0.27$^{\#\#}$**	**0.94±0.55***	1.11±0.43	**1.55±0.47****	2.35±1.15
	OSX	0.67±0.13	**1.03±0.42$^{\#}$**	0.81±0.31	**1.18±0.21$^{\#}$**	**1.31±0.55***	1.40±0.26	**1.36±0.28****	1.29±0.28
	ERα	0.98±0.25	0.91±0.24	0.82±0.17	1.00±0.13	0.85±0.08	**1.00±0.05$^{\#\#}$**	1.06±0.12	1.18±0.25
	ALP	0.35±0.06	**0.99±0.50$^{\#\#}$**	**0.54±0.16***	**1.19±0.13$^{\#\#}$**	**0.89±0.49***	1.28±0.18	**0.83±0.31****	0.88±0.17
	POSTN	0.97±0.33	0.74±0.23	0.92±0.33	**1.35±0.13$^{\#}$**	0.96±0.38	0.91±0.15	1.10±0.48	1.02±0.38
	TRAcP	0.81±0.24	0.55±0.04	1.14±0.39	**1.49±0.22$^{\#}$**	0.88±0.11	1.11±0.26	1.24±0.50	1.09±0.21
	RANKL	0.83±0.22	0.80±0.10	0.96±0.43	0.98±0.16	1.17±0.44	1.28±0.37	1.21±0.51	1.23±0.53
	CATH-K	0.61±0.21	0.47±0.13	**1.38±0.56***	1.73±0.22	**0.96±0.21***	1.26±0.48	1.07±0.61	0.95±0.29
	OPN	2.01±0.52	**1.06±0.33$^{\#}$**	ND	ND	1.64±0.53	2.15±0.54	ND	ND
	BSP	1.19±0.26	**1.63±0.39$^{\#}$**	1.29±0.45	**2.64±0.64$^{\#\#}$**	ND	ND	ND	ND
	DMP1	0.87±0.11	**0.57±0.23$^{\#}$**	1.26±0.50	**2.34±0.53$^{\#}$**	**0.24±0.13****	0.44±0.23	0.94±0.39	0.91±0.27
	MEPE	0.23±0.12	0.16±0.06	0.29±0.10	**0.45±0.07$^{\#}$**	**2.24±0.67***	2.39±0.36	**2.32±0.96***	1.47±0.22
Tibial cortex (Cortical bone)	OCN	1.03±0.35	1.07±0.50	1.01±0.16	**0.61±0.22$^{\#\#}$**	**1.60±0.63***	**0.95±0.21$^{\#}$**	0.78±0.31	1.04±0.49
	SCLN	1.56±0.73	1.15±0.63	**2.24±0.98***	**1.29±0.50$^{\#}$**	2.02±0.79	**0.89±0.40$^{\#\#}$**	1.07±0.38	1.12±0.58
	ERα	1.01±0.15	0.97±0.20	**1.26±0.27***	1.49±0.40	0.93±0.35	1.01±0.44	0.96±0.30	0.84±0.23
	POSTN	0.87±0.35	1.07±0.46	2.36±2.53	4.36±4.77	0.91±0.39	1.37±0.68	1.15±0.48	0.96±0.43
	RANKL	0.61±0.28	0.66±0.26	**1.91±1.24*****	1.31±0.85	0.74±0.28	0.69±0.42	0.64±0.28	0.54±0.10
	CATH-K	0.74±0.45	0.53±0.27	**1.81±1.04****	1.07±0.52	0.77±0.31	0.73±0.55	0.39±0.23	**0.69±0.25$^{\#}$**
	OPN	1.58±0.55	1.31±0.33	ND	ND	**2.10±0.81***	1.09±0.61	ND	ND
	BSP	1.78±0.69	1.62±0.54	**2.45±0.48***	**1.30±0.49$^{\#\#\#}$**	ND	ND	ND	ND
	DMP1	1.07±0.27	1.04±0.37	**1.76±0.54****	**1.11±0.33$^{\#\#}$**	1.16±0.58	**0.45±0.18$^{\#\#}$**	0.79±0.36	**1.26±0.45$^{\#}$**
	MEPE	0.20±0.10	0.13±0.06	**0.33±0.16***	**0.14±0.05$^{\#\#}$**	**3.96±1.56*****	**1.16±0.54$^{\#\#\#}$**	**2.04±1.05*****	2.22±0.97

1G: control mice; 2G: mice centrifuged at 2G for 3 weeks (see Methods). Abbreviations: GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (housekeeping gene); OCN: osteocalcin; OSX: osterix; ERα: estrogen receptor alpha; ALP: alkaline phosphatase; POSTN: periostin; TRAcP: tartrate-resistant acid phosphatase; RANKL: receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; CATH-K: cathepsin K; OPN: osteopontin; BSP: bone sialoprotein; DMP1: dentin matrix protein 1; MEPE: matrix extracellular phosphoglycoprotein; SCLN: sclerostin; ND: not detected. Values are Mean±SD of 5-10 mice/group, in **bold** when p<0.05. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ vs WT 1G; $^{\#}$: $p < 0.05$, $^{\#\#}$: $p < 0.01$ vs genotype-matched 1G; Mann-Whitney *U* test.

Table S4: Effects of whole body vibration on architectural and dynamic bone parameters.

Bone	*Compartment*	*Parameters*	*Genotypes*							
			WT		*OPN$^{-/-}$*		*BSP$^{-/-}$*		*DKO*	
			CT	*VB*	*CT*	*VB*	*CT*	*VB*	*CT*	*VB*
L2 Vertebra	*Trabecular bone*	BV/TV (%)	16±4	16±4	**23.3±4.7****	**19.1±3.8$^{\#}$**	**24.1±4.58****	25.8±4.5	**21.2±5.0***	20.1±2.6
		Tb.Th (µm)	47±3	47±3	**53±3****	**50±3$^{\#}$**	**53±4***	54±3	**52±3****	50±2.1
		Tb.N (1/mm)	4.1±0.5	4.1±0.5	**4.6±0.6***	**4.0±0.2$^{\#\#}$**	**4.60±0.44***	4.91±0.38	4.45±0.53	4.41±0.34
		Tb.Sp (mm)	240±33	244±33	209±29	**235±24$^{\#}$**	**213±26***	195±16	222±27	221±21
		Conn. D (1/mm^3)	117±29	118±32	**153±34***	137±30	**163±24***	176±23	146±40.	155±29
		SMI	1.4±0.3	1.5±0.3	**1.0±0.4***	**1.4±0.2$^{\#}$**	**0.8±0.4****	0.7±0.4	1.2±0.5	1.2±0.2
Femur	*Whole bone*	Length	15.6±0.6	15.9±0.3	15.6±0.4	15.6±0.3	**15.0±0.4****	14.9±0.4	15.7±0.6	15..6±0.4
	Trabecular bone	BV/TV (%)	10.9±2.2	9.9±1.7	**19.0±6.6****	13.9±3.9	**15.4±3.9***	15.4±3.9	**15.7±6.4***	12.2±1.6
		Tb.Th (µm)	56±4	58±5	58±5	60±9	55±4	55±4	57±5	55±3
		Tb.N (1/mm)	3.6±0.4	3.4±0.4	**4.4±0.8***	**3.6±0.7$^{\#}$**	**4.1±0.6***	4.3±0.5	3.9±1.0	3.4±0.4
		Tb.Sp (µm)	278±33	298±46	**229±55***	**287±66$^{\#}$**	**244±49***	228±28	268±87	297±44
		Conn. D (1/mm3)	56±19	**42±10$^{\#}$**	**117±46***	**82±27$^{\#}$**	**103±31****	107±36	95±50	69±17
		SMI	2.4±0.3	2.6±0.3	**1.8±0.5***	2.0±0.5	**2.1±0.2***	2.2±0.3	**2.0±0.5***	2.3±0.1
		MS/BS (%)	24.95±6.10	31.41±5.42	17.51±4.86	21.61±8.57	28.67±7.99	27.38±9.85	21.18±4.61	33.05±5.50
		MAR (µm/d)	0.96±0.06	1.05±0.05	0.96±0.1	1.00±0.16	1.04±0.14	0.90±0.15	1.06±0.16	1.31±0.24
		BFR/BS (µm^3/µm^2/d)	0.24±0.07	0.33±0.07	0.17±0.06	0.22±0.12	0.30±0.11	0.25±0.11	0.22±0.05	0.44±0.12
		Oc.S/BS (%)	1.3±0.3	2.1±0.5	1.4±0.5	2.4±0.9	1.6±0.3	1.4±0.3	1.83±0.41	2.61±0.71
		N.Oc/B.Pm (/µm)	10.9±1.6	14.9±3.3	12.5±3.8	18.4±5.3	12.9±1.5	12.1±1.8	14.7±3.07	18.98±30
		Oc.Le (µm)	10.0±2.0	11.8±1.4	9.2±1.2	10.6±1.6	10.4±1.6	10.0±1.9	10.66±1.52	11.32±1.62
	Cortical bone	Ct.Th (µm)	243±13	236±11	**261±18***	**238±14$^{\#\#}$**	**180±7*****	**192±12$^{\#\#}$**	**226±13***	228±10
		Ct.Ar (mm^2)	0.93±0.08	0.90±0.07	**1.0±0.11***	**0.92±0.09$^{\#}$**	**0.76±0.07*****	0.81±0.07	0.95±0.20	0.91±0.08
		Tt.Ar (mm^2)	1.55±0.16	1.52±0.13	1.68±0.17	**1.53±0.11$^{\#}$**	1.68±0.26	1.68±0.15	1.53±0.33	1.44±0.12
		Ma.Ar/Tt.Ar (%)	39.7±3.0	40.6±1.7	38.2±1.6	39.6±2.3	**54.11±3.71*****	51.25±2.21	38.12±2.57	36.79±3.11
		pMOI (mm^4)	0.33±0.07	0.32±0.06	0.40±0.08	**0.32±0.05$^{\#}$**	0.32±0.09	0.34±0.06	0.34±0.14	0.29±0.04
		Imax (mm^4)	0.21±0.05	0.21±0.04	0.26±0.05	**0.21±0.04$^{\#}$**	0.21±0.05	0.22±0.04	0.22±0.10	0.18±0.03
		Imin (mm^4)	0.12±0.02	0.11±0.02	0.13±0.02	**0.11±0.02$^{\#}$**	0.12±0.03	0.12±0.02	0.12±0.04	0.10±0.02
		Imax/Cmax (mm^3)	0.24±0.04	0.24±0.03	0.29±0.04	**0.25±0.03$^{\#}$**	0.23±0.04	0.24±0.03	0.26±0.09	0.23±0.03
		Imin/Cmin (mm^3)	0.19±0.02	0.19±0.02	0.21±0.04	**0.18±0.02$^{\#}$**	0.18±0.04	0.19±0.02	0.18±0.05	0.17±0.02
		Ct.Po (%)	2.1±0.2	1.9±0.3	1.9±0.2	2.2±0.3	**2.8±0.4****	2.7±0.3	**3.3±0.9****	3.0±0.8
		TMD (mg HAP/cm^3)	1329±19	1334±15	1331±18	1315±20	**1268±28*****	1270±17	**1293±26****	**1272±13$^{\#}$**
		Ec. MPm/BPm (%)	56.79±19.96	63.23±11.45	**38.27±14.22***	**20.70±11.60$^{\#\#}$**	65.30±9.83	65.23±7.12	51.21±14.06	60.37±14.10
		Ec. MAR (µm/d)	0.80±0.20	0.76±0.10	0.87±0.14	0.74±0.17	0.64±0.10	**0.89±0.11$^{\#\#}$**	0.66±0.11	0.76±0.10
		Ec. BFR/BPm (µm^3/µm^2/d)	0.66±0.26	0.73±0.18	0.50±0.20	**0.23±0.12$^{\#\#}$**	0.62±0.08	**0.87±0.11$^{\#\#}$**	0.50±0.15	0.69±0.22
		Ec. Oc.Pm/BPm (%)	3.16±3.59	3.95±2.91	**9.37±6.58***	**18.29±9.46$^{\#}$**	**10.77±4.26****	9.55±4.83	10.95±8.88	10.24±9.52
		Ps. MPm/BPm (%)	39.94±3.79	42.67±3.64	42.14±7.19	46.54±9.73	44.31±6.61	48.05±3.88	**43.73±3.47***	46.60±8.62
		Ps. MAR (µm/d)	0.93±0.28	0.97±0.14	0.96±0.16	**0.77±0.18$^{\#}$**	0.81±0.15	0.97±0.11	0.87±0.22	0.89±0.14
		Ps. BFR/BPm (µm^3/µm^2/d)	0.38±0.13	0.41±0.07	0.41±0.13	0.37±0.14	0.36±0.08	**0.46±0.05$^{\#\#}$**	0.39±0.13	0.41±0.06
		Ps. Oc.Pm/BPm (%)	1.6±0.8	2.18±1.09	**0.71±0.67***	1.14±0.91	**6.81±3.17****	**2.17±1.58$^{\#}$**	1.24±0.67	1.57±1.51

Abbreviations: BV/TV: bone volume / tissue volume; Tb.Th: trabecular thickness; Tb.N: trabecular number; Tb.Sp: trabecular separation; Conn.D: connection density; SMI: structure model index; MS/BS: mineralized surface / bone surface; MAR: mineral apposition rate; BFR/BS: bone formation rate / bone surface; Oc.S/BS: osteoclast surface / bone surface; N.Oc/BS: number of osteoclast / bone surface; Oc.Le: osteoclast length; Ct.Th: cortical thickness; Ct.Ar: cortical area; Tt.Ar: total area; Ma.Ar/Tt.Ar: Marrow area fraction; pMOI: polar moment of inertia; Imax: maximal areal moment of inertia; Imin: minimal areal moment of inertia; Imax/Cmax and Imin/Cmin: section module; Ct.Po: cortical porosity; TMD: tissue mineral density, Ec. MPm/BPm: endocortical mineralized perimeter / bone perimeter; Ec. MAR: endocortical mineral apposition rate; Ec. BFR/BPm: endocortical bone formation rate / bone perimeter; Ec. Oc.Pm/BPm: endocortical osteoclast perimeter / bone perimeter; Ps. MPm/BPm: periosteal mineralized perimeter / bone perimeter; Ps. MAR: periosteal mineral apposition rate; Ps. BFR/BPm: periosteal bone formation rate / bone perimeter; Ps. Oc.Pm/BPm: periosteal osteoclast perimeter / bone perimeter. Values are Mean ± SD of 5-10 mice/group, in **bold** when p<0.05. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ vs WT CT mice; $^{\#}$: $p < 0.05$, $^{\#\#}$: $p < 0.01$ vs genotype-matched CT; Mann-Whitney *U* test.

Table S5: Effects of whole body vibration on gene expression in cortical tibia.

Genes	*Genotypes*							
	WT		*OPN*$^{-/-}$		*BSP*$^{-/-}$		*DKO*	
	CT	*VB*	*CT*	*VB*	*CT*	*VB*	*CT*	*VB*
OCN	0.76±0.36	1.13±0.80	0.90±0.28	0.66±0.22	**1.41±0.91***	0.98±0.43	**1.60±0.81****	2.55±1.29
SCLN	5.11±1.39	4.52±2.68	5.01±2.39	4.61±1.88	5.06±1.76	4.04±2.39	5.82±2.27	6.73±2.26
POSTN	0.66±0.59	0.75±0.52	1.47±0.91	2.09±1.76	0.75±0.56	0.40±0.34	0.80±0.73	0.99±0.78
RANKL	0.57±0.20	0.61±0.38	**1.22±0.69***	1.05±0.79	0.75±0.31	**0.33±0.13**$^{\#}$	**0.92±0.47***	0.90±0.58
Cath-K	0.38±0.20	0.41±0.49	**1.41±0.66*****	0.98±0.48	**0.69±0.37***	**0.30±0.16**$^{\#}$	**1.88±0.87*****	1.67±0.80
OPN	1.81±0.69	2.06±1.57	ND	ND	2.67±1.23	**1.14±0.69**$^{\#}$	ND	ND
BSP	0.85±0.58	0.85±0.76	**1.42±0.50***	1.34±0.77	ND	ND	ND	ND
DMP1	0.79±0.27	0.72±0.44	**1.26±0.32****	1.26±0.39	**0.51±0.33****	0.61±0.37	**1.27±0.57***	1.73±0.75
MEPE	0.16±0.05	0.12±0.06	0.24±0.14	0.20±0.09	**2.17±1.08*****	1.56±0.50	**3.43±1.29*****	4.60±1.46

Abbreviations: GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (housekeeping gene); OCN: osteocalcin; SCLN: sclerostin; POSTN: periostin; RANKL: receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; CATH-K: cathepsin K; OPN: osteopontin; BSP: bone sialoprotein; DMP1: dentin matrix protein 1; MEPE: matrix extracellular phosphoglycoprotein. Values are Mean ± SD, written in bold when significant. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ vs WT CT mice; $^{\#}$: $p < 0.05$ vs CT matched mice; Fisher's *t*-test or Mann-Whitney *U* test; N = 5-10 mice/group.

B. La vibration corps entier induit des effets opposés sur la dynamique de formation et les paramètres architecturaux des lacunes ostéocytaires chez les souris déficientes en Ostéopontine ou en Sialoprotéine osseuse (article en préparation)

1. Contexte de l'étude

La vibration corps entier a montré des effets opposés sur l'os cortical des souris $BSP^{-/-}$ et $OPN^{-/-}$, sans aucune modification architecturale chez les souris WT et DKO. L'histomorphométrie réalisée après deux injections de marqueur en fin de séquence expérimentale et l'histoenzymologie de la TRAcP suggèrent une augmentation de l'activité de formation et une diminution de l'activité de résorption chez les souris $BSP^{-/-}$ amenant à une augmentation de l'épaisseur corticale. A l'inverse, les souris $OPN^{-/-}$ ont présenté des activités cellulaires globalement opposées à celles des $BSP^{-/-}$, induisant donc une perte osseuse dans le même compartiment. Cependant, ces activités ont été analysées en fin d'expérimentation et ces résultats ne permettent pas de décrire la dynamique osseuse tout au long du protocole de vibration qui a duré 6 semaines. Pour effectuer cette analyse, nous avons répété cette même expérience en réalisant plusieurs injections de deux fluorochromes (le rouge d'alizarine et le bleu de calcéine) à différents stades, avant et pendant la période de vibration. Ce protocole permettra ainsi de mieux caractériser la dynamique corticale des 4 génotypes à l'état de base afin de décrire leur cinétique de modelage, mais aussi les modifications de cette cinétique induites par la vibration.

Le deuxième volet de cette étude vise l'analyse du réseau lacuno-canaliculaire. Etant donné que les ostéocytes ont été décrits par plusieurs études comme étant un important mécano-senseurs dans l'os (Qin et al., 2020; Robling & Bonewald, 2020), nous avons marqué le réseau qui les contient par la fluorescéine, qui est une molécule fluorescente de 0.4 kDa et 0.9 nm, capable de se diffuser dans des espaces très fins comme les canalicules (Ciani et al., 2009; Wang, 2018). L'imagerie des os contenant de la fluorescéine permet de décrire plusieurs paramètres architecturaux du réseau lacuno-canaliculaire tels que la densité, l'aire, la forme des lacunes mais aussi les embranchements et la longueur des canalicules. Cette technique a été récemment mise en place au laboratoire et a été utilisée dans la thèse du Dr. Mélanie Dhayer, soutenue le 09/12/2019 : « Régulation transcriptionnelle du tissu osseux lors de vols spatiaux : focus sur les cellules souches squelettiques et les ostéocytes » (Dhayer, 2019) et la thèse du Dr. Laura Peurière, soutenue le 12/02/2021 : « Rôle des ostéocytes dans la perte osseuse d'immobilisation, préparation du vol spatial BION M2 » (Peuriere, 2021).

Parmi les paramètres du réseau lacuno-canaliculaire, l'aire lacunaire a été décrite comme étant dépendante des conditions physiologiques et/ou pathologiques (Vahidi et al., 2020). Ainsi, par exemple, plusieurs études ont montré une augmentation de l'aire ou du volume des lacunes ostéocytaires chez des rongeurs femelles en lactations (Hemmatian, Jalali, et al., 2018; Kaya et al., 2017) ou ovariectomisées (Gatti et al., 2018; Lane et al., 2006; Sharma et al., 2012; Stern et al., 2018).

A l'inverse, ces paramètres évoluent à la baisse dans des modèles de vieillissement (Hemmatian, Laurent, et al., 2018; Heveran et al., 2018, 2019; Tiede-Lewis et al., 2017) ou de décharge mécanique (Britz et al., 2012; Gerbaix et al., 2017; Swift et al., 2014). Dans des modèles pathologiques tels que l'hypophosphatémie lié à l'X, il a été démontré par plusieurs études une augmentation de la taille des lacunes (Hoac et al., 2020; Tokarz et al., 2018; Yuan et al., 2021). Ce dernier phénotype est potentiellement lié à l'hypominéralisation du tissu osseux qui est due à une mutation invalidante du gène codant pour PHEX, favorisant la libération et donc l'activité hypominéralisante du peptide ASARM. Nos souris $BSP^{-/-}$ et DKO présentent une hypominéralisation qui pourrait résulter de la surexpression de MEPE (x80 chez les $BSP^{-/-}$ et x33 chez les DKO à 2 mois), cette protéine étant l'une des plus importantes sources d'ASARM (Bouleftour et al., 2019). L'étude du réseau ostéocytaire chez ces deux génotypes à l'état de base peut donc s'avérer utile pour la compréhension de leur phénotype.

Un autre paramètre du réseau lacuno-canaliculaire souvent étudié est la densité lacunaire. Ce paramètre a montré des modifications dans certaines études, plus rares que celles portant sur les aires lacunaires (Vahidi et al., 2020). La plupart du temps, c'est dans les modèles de vieillissement que la densité lacunaire a été décrite comme basse. Dans le modèle de l'hypophosphatémie lié à l'X, il a été démontré une augmentation de la densité lacunaire (Tokarz et al., 2018), ce qui constitue un autre paramètre intéressant à observer chez les souris $BSP^{-/-}$ et DKO.

Les canalicules quant à eux sont moins souvent décrits du fait de la difficulté à fournir une imagerie adéquate, à cause de leur taille très fine. Cependant, certaines études ont pu observer une augmentation du diamètre canaliculaire chez des souris ayant participé à un vol spatial (Blaber et al., 2013) ou une chute du nombre de canalicules dans un modèle de vieillissement (Tiede-Lewis et al., 2017).

Les études sur le réseau lacuno-canaliculaire dans des modèles de contrainte mécanique anabolique *in vivo* sont rares et n'apportent pas d'évidence sur d'éventuels effets de ces stimuli sur l'architecture de du réseau (Gardinier et al., 2018; Suniaga et al., 2018). Cependant, un paramètre confondant qui subsiste dans les études est que le réseau est analysé dans sa globalité en fin d'expérience, et non pas en cinétique. En d'autres termes, le réseau formé pendant la contrainte n'est pas analysé indépendamment du reste de l'os cortical. Le mélange des réseaux formés avant et pendant la contrainte peut masquer les effets réels de l'expérimentation. Pour pallier à ce problème, des injections séquentielles de fluorochromes tels que le rouge d'alizarine et le bleu de calcéine permettent de délimiter précisément les réseaux lacuno-canaliculaires formés à des moments précis de l'expérimentation.

Ainsi dans cette seconde étude, les 4 génotypes seront étudiés à l'état de base (sans contrainte) et sous vibration, en couplant l'analyse de la dynamique corticale à long terme et celle du réseau lacuno-canaliculaire. Cette association de techniques permettra d'affiner les analyses du réseau lacuno-canaliculaire car l'âge exact auquel la zone étudiée a été formée sera connu par la délimitation des lignes d'alizarine et de calcéine. De ce fait l'analyse portera sur des zones de même âge, formées pendant une même période.

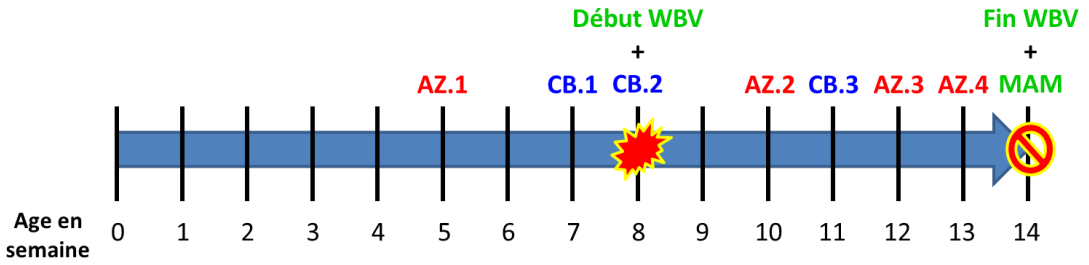
2. Matériels et méthodes

a. Vibration du corps entier

Le protocole de vibration employé était le même que dans la première étude. Des souris de 8 semaines d'âge ont été réparties en 2 groupes : un groupe contrôle (CT) et un groupe vibré (VB) pour chacun des 4 génotypes (WT, OPN$^{-/-}$, BSP$^{-/-}$ et DKO) avec n=6 souris par groupe pour chaque génotype. La vibration (WBV) a été réalisée en utilisant les paramètres précédemment décrits, c'est-à-dire 2G d'accélération, 90Hz de fréquence, 15 minutes par jour, 5 jours par semaine pendant 6 semaines. Les souris CT ont été déposées sur les plateaux de vibration éteints pendant la même durée.

b. Protocole d'injection de fluorochromes

Les souris de tous les groupes ont été injectées par voie intra-péritonéale avec 25 mg/kg de rouge d'alizarine (AZ, Sigma Aldrich) ou 50 mg/kg de bleu de calcéine (CB, Sigma Aldrich), selon le plan d'injection décrit en figure 25. A l'âge de 5 et 7 semaines, toutes les souris ont reçu une injection d'AZ et une injection de CB respectivement. Ensuite à 8 semaines, une seconde injection de CB a été réalisée et le protocole de vibration a débuté pour se terminer à l'âge de 14 semaines. Durant le protocole, les souris ont été injectées avec l'AZ à 10, 12 et 13 semaines et avec la CB à 11 semaines. L'alternance entre les marquages AZ et CB permet de connaître précisément à quelle semaine correspond chaque marquage.



Légende:

WBV: Whole Body Vibration (Vibration corps entier)
MAM: Mise à Mort
AZ.n: Injection de rouge d'alizarine; n indique le numéro de l'injection
CB.n: Injection de bleu de calcéine; n indique le numéro de l'injection

Figure 25 : Plan expérimental utilisé *in vivo* pour la réalisation d'un multi-marquage au rouge d'alizarine (AZ) et au bleu de calcéine (CB) avant et pendant le protocole de vibration.

c. Mise à mort et prélèvement

A la fin de l'expérience, les souris ont été anesthésiées avec 2% d'isoflurane à débit de 0,8 ml/min puis décapitées. Pour chaque souris, le fémur droit a été prélevé, nettoyé des muscles et autres tissus et découpé transversalement à sa partie proximale grâce à un scalpel. Les ¾ restants du fémur ont été centrifugés pour éliminer la moelle osseuse et déposés dans l'éthanol absolu contenant 2% de fluorescéine sodique (#F6377, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, Etats-Unis). Ces échantillons ont été stockés à l'abri de la lumière à 4°C.

d. Imagerie de l'os cortical

En partant de la plaque de croissance distale, les fémurs ont été coupés transversalement en tranches sériées de 400 µm d'épaisseur avec une scie à fil diamantée (Escil, Chassieu, France) ; les tranches ont été stockées dans l'éthanol absolu contenant 2% de fluorescéine. Pour chaque souris, la 13ème tranche, correspondant à la zone de l'os cortical fémoral analysée dans la première étude, a été employée pour analyser la dynamique osseuse et le réseau lacuno-canaliculaire. Les tranches d'os cortical choisies pour l'analyse ont été rincées deux fois dans l'éthanol absolu pour éliminer l'excès de fluorescéine puis transférées ensuite dans une solution de transparisation composée de 89% de benzyle benzoate (Sigma-Aldrich) et de 11% d'alcool benzylique (Sigma-Aldrich), avant mise sous vide pendant 30 minutes. Des composants tissulaires tels que les lipides, les protéines mais aussi le minéral constituent des obstacles pour la microscopie du fait qu'elles absorbent ou diffusent la source lumineuse (Dallas & Moore, 2020). La solution de transparisation a pour but ici de permettre une observation du tissu osseux en profondeur grâce à l'établissement d'un indice de réfraction uniforme à travers l'ensemble du tissu, qui permet le passage de la lumière à travers l'échantillon (Jing et al., 2019). Les tranches ont ensuite été déposées sur une lamelle dans une fine goutte de la solution de transparisation. Des images ont été réalisées avec un microscope confocal 800 Airyscan (Carl Zeiss, Obserkochen, Allemagne) couplé au logiciel ZEN (Carl Zeiss, Oberkochen, Allemagne). Tout d'abord, une image de la tranche d'os cortical a été réalisée avec l'objectif 20X. La fluorescéine, le rouge d'alizarine et le bleu de calcéine ont été visualisés à 488 nm, 561 nm et 405 nm de longueur d'onde, respectivement. A la suite de l'imagerie à 20X, une acquisition à l'objectif 63X avec huile à immersion a été réalisée en ciblant la partie antérieure de l'os sur la zone endostée présentant la plus forte dynamique (et donc le plus d'espacement entre les lignes de formation) afin d'augmenter le plus possible la surface du réseau lacuno-canaliculaire analysé. Cette acquisition a été réalisée en effectuant des piles (« stacks ») de 6 images espacées de 5µm, totalisant donc une épaisseur de 30 µm. Les informations sur les paramètres d'acquisition utilisés pour l'imagerie avec les objectifs 20X et 63X sont détaillés dans les annexes méthodologiques **V) B** et **V) C**, respectivement.

e. Analyse des dynamiques corticales

Les analyses ont été réalisées par des mesures d'aires avec le logiciel ImageJ. Les étapes de la procédure sont décrites dans l'annexe méthodologique **V) D.** La figure 26 présente un exemple d'image d'os cortical obtenue au grossissement 20X, accompagné de légendes explicatives de la dynamique globale. La zone d'os cortical analysée est soumise à un drift dans lequel la partie postérieure de l'os (excepté un fragment postéro-médial) subit une formation périostée et une résorption endostée alors que la partie antérieure (et un fragment postéro-médial) subit une résorption périostée et une formation endostée. Ces deux dynamiques sont séparées par un axe de neutralité mécanique qui passe, dans une région de drift fémoral, par la partie latérale et par le fragment postéro-médial de l'os cortical. Pour simplifier, nous décrirons les deux zones séparées par l'axe de neutralité mécanique sous les noms de « compartiment postérieur » et de « compartiment antérieur » (figure 26).

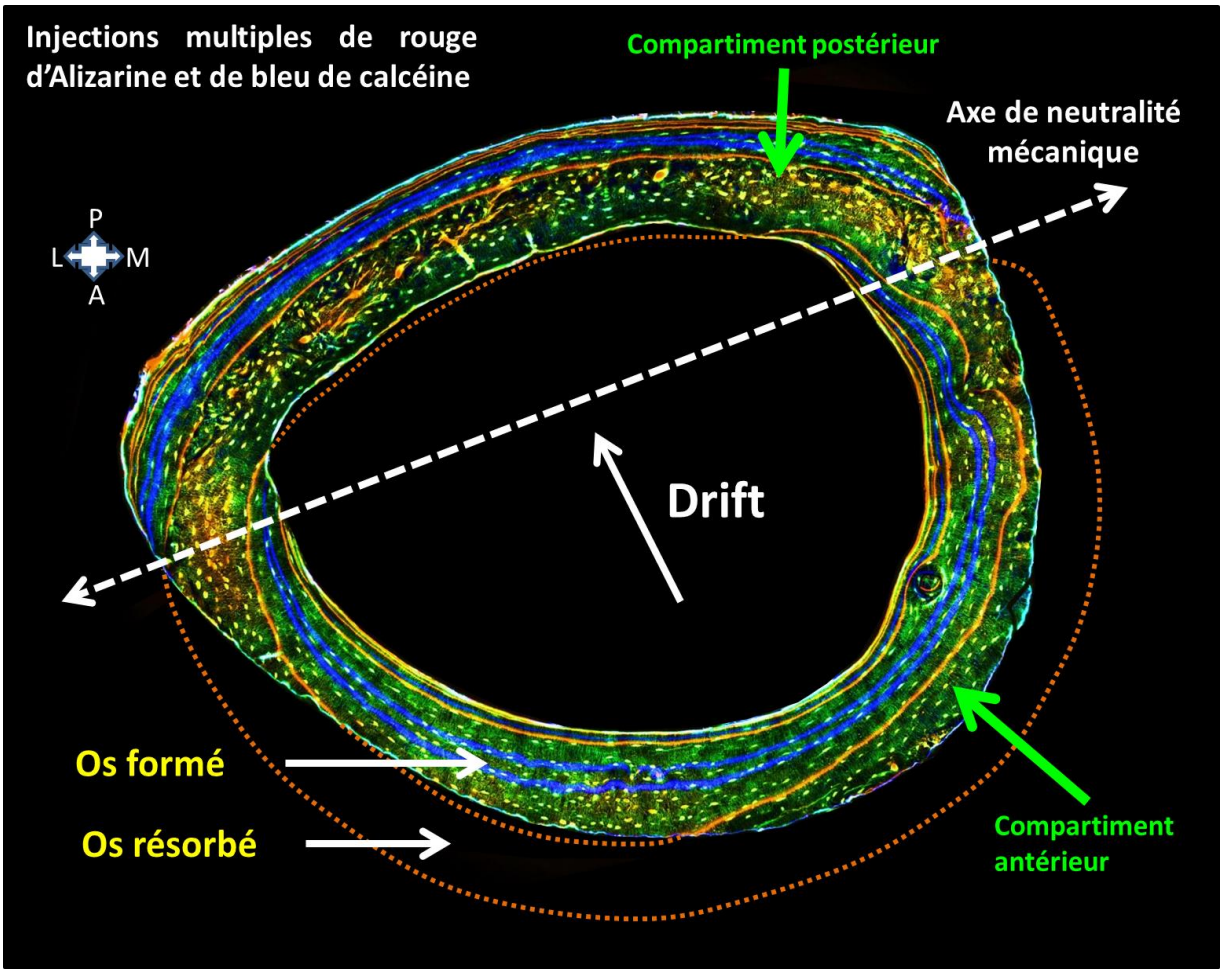


Figure 26 : Image d'une tranche d'os cortical d'une souris ayant subi le protocole de multi-marquage au rouge d'alizarine et au bleu de calcéine. Les lignes bleues correspondent aux injections de bleu de calcéine. Les lignes orange continues sur l'os correspondent aux injections d'alizarine. Les lignes orange discontinues ont été complétées par traçage manuel pour illustrer la résorption théorique qui a eu lieu au cours du drift. La direction de ce dernier est indiquée par la flèche blanche continue représentée au milieu de la moelle. La double flèche en pointillé visualise l'axe de neutralité mécanique qui correspond à la limite virtuelle entre, d'une part, une formation endostée et une résorption périostée situées majoritairement sur la partie antérieure de l'os (nommée compartiment antérieur), et d'autre part, une formation périostée et une résorption endostée situées sur la partie postérieure de l'os (nommée compartiment postérieur).

Du fait de la compartimentation des activités cellulaires, les aires entre 2 lignes consécutives ont été mesurées séparément entre l'endoste et le périoste. La mesure des paramètres de formation standard (MPm/BPm, MAR et BFR/BPm) n'est pas applicable dans ce contexte de drift pour plusieurs raisons. Tout d'abord, le périmètre total de l'os (BPm) sur lequel est normalisé le périmètre minéralisé (MPm) n'est applicable correctement que pour la dernière ligne d'injection qui a lieu une semaine avant la fin du protocole. Les autres lignes d'injections sont loin du bord osseux et ne peuvent donc pas être normalisées par ce dernier. De plus, le périmètre osseux évolue au cours des semaines par les activités de formation et de résorption. De ce fait, si on normalise une ligne de formation injectée par exemple 6 semaines avant le sacrifice par le BPm final, le résultat sera affecté par les dynamiques ayant lieu dans les 6 semaines après la ligne d'injection, constituant donc un facteur confondant. Pour la MAR (donc la distance moyenne entre les lignes), dans un contexte de dynamique de formation sur une partie du périmètre osseux, elle doit être associée à une surface de minéralisation (MPm/BPm) pour avoir une signification biologique. Elle n'est donc pas complètement adéquate pour évaluer l'activité de formation dans ce contexte précis. Elle serait correctement applicable si le périmètre total était en activité de formation. Pour toutes ces raisons, ni le MPm/BPm, ni la MAR et donc pas non plus le BFR/BPm ne sont applicables pour l'analyse de la dynamique sur plusieurs semaines dans ce contexte. Ce raisonnement nous a donc orienté vers les mesures d'aires inter-lignes.

Il est à noter que chez toutes les souris de notre protocole, la ligne d'injection réalisée à la 5ème semaine d'âge (première ligne AZ = AZ.1, Figure 25) est partiellement résorbée en endoste et en périoste. De ce fait toutes les mesures ont été réalisées à partir de la ligne d'injection de la 7ème semaine d'âge (première ligne CB = CB.1, Figure 25). Le retraçage manuel de la ligne d'injection à 5 semaines d'âge peut être utilisé pour estimer une aire d'os résorbée depuis l'injection de la ligne jusqu'à la mise à mort. Cependant cette interpolation est aléatoire et ne peut être utilisée comme base solide pour effectuer des comparaisons fines d'aires résorbées. Elle est encore moins utilisable pour estimer une cinétique de résorption dans le temps.

f. Mesures effectuées pour comparer les génotypes à l'état de base

Les dynamiques de formation osseuse corticale des souris à l'état de base (contrôle) ont été comparées en prenant en compte tout d'abord les valeurs brutes, c'est-à-dire les aires d'os déposées par semaine. Ce premier paramètre indique uniquement l'activité de formation indépendamment de la masse osseuse totale, qui est modulée par les activités de formation mais aussi de résorption. Ce paramètre sera présenté pour chaque zone inter-marquage, mais aussi de manière cumulative au cours du temps.

Un deuxième paramètre est la dynamique relative à l'aire corticale, c'est-à-dire la mesure de l'activité de formation par rapport à la quantité d'os finale. Du fait que la distribution des activités de formation et de résorption est inverse entre le compartiment antérieur et le compartiment postérieure de la corticale, une normalisation par l'aire corticale totale n'est pas adéquate, et il faut rapporter les

quantités d'os déposées à l'aire totale du compartiment concerné (antérieur ou postérieur). Comme on peut le voir sur la Figure 27, l'axe de neutralité mécanique ne coïncide pas avec la frontière entre les compartiments antérieur (pour la formation endostée) et postérieur (pour la formation périostée). La frontière entre ces deux zones a donc été tracée en se basant sur les points de disparition (due à l'activité de résorption) de la ligne d'injection à 5 semaines d'âge (ligne AZ.1) en endoste et en périoste, sur la partie latérale d'une part et sur la partie postéro-médiale d'autre part. Cette délimitation définit donc une ligne de neutralité mécanique qui correspond à la frontière entre les deux compartiments en se basant sur la dynamique de chaque tranche d'os cortical (Figure 27). Les aires d'os cortical de part et d'autre de la ligne de neutralité mécanique ont alors été utilisées pour normaliser les activités de formation endostée (antérieure) et périostée (postérieure). Plus le modelage (formation et résorption) d'un compartiment sera rapide et plus la valeur normalisée sera élevée.

Nous avons présenté nos résultats sous forme de courbes d'accroissement de la quantité d'os déposé, où les aires mesurées entre deux lignes d'injection sont normalisées sur celle de l'ensemble du compartiment concerné. Ceci permettra de visualiser plus facilement la différence entre les résultats bruts (présentée précédemment) et les résultats normalisés par compartiment. La normalisation sur l'aire des compartiments a été utilisée uniquement pour comparer le drift des souris à l'état de base, afin d'identifier les effets des extinctions géniques sur le modelage de l'os cortical en prenant en compte la partie antérieure (et postéro-médiale) et la partie postérieure séparément, étant donné que leurs dynamiques sont opposés en endoste et en périoste.

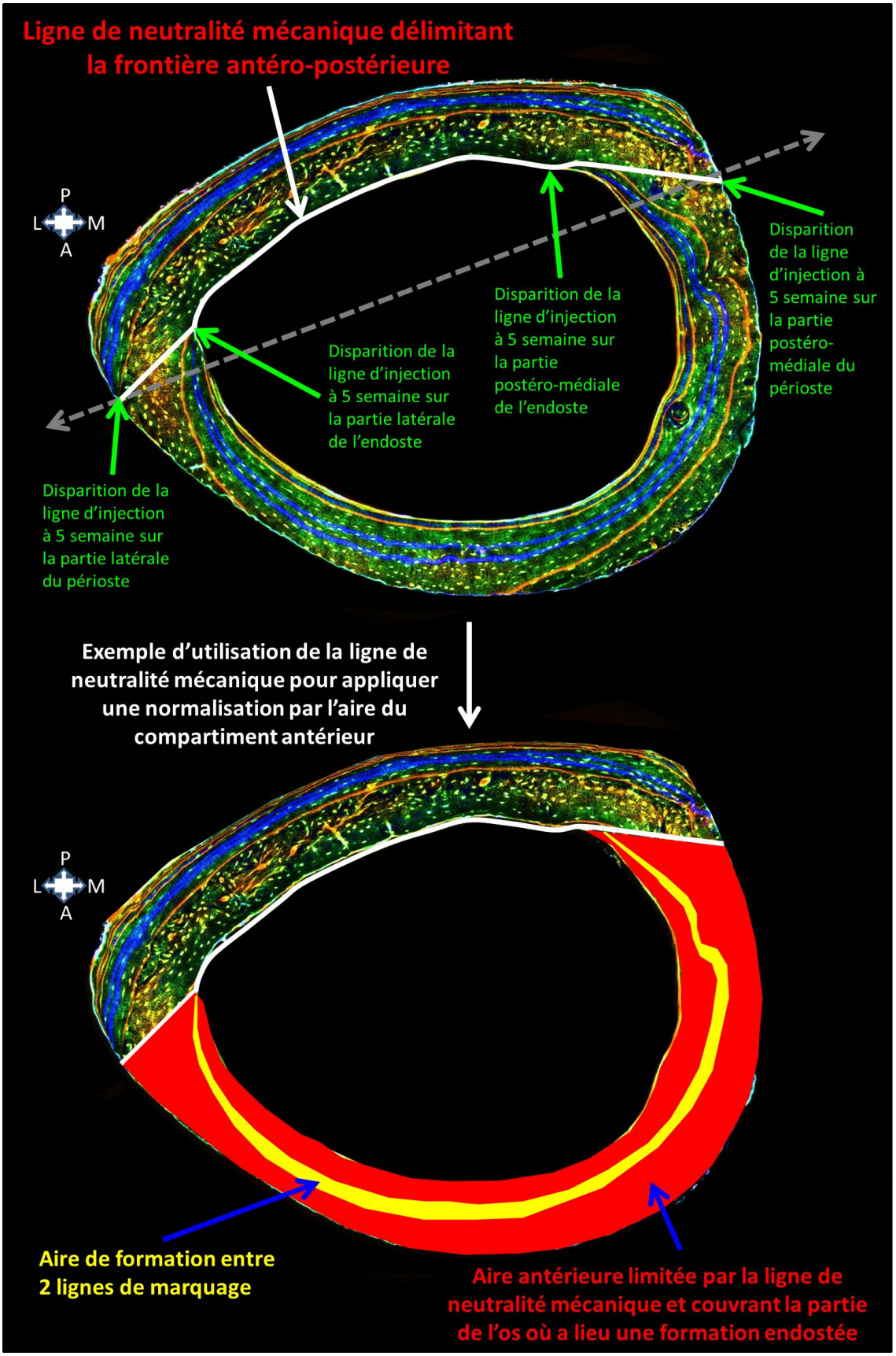


Figure 27 : Illustration de la délimitation de la ligne de neutralité mécanique (image du haut) et de la normalisation de l'aire d'os déposé entre 2 lignes de marquage (en jaune) sur l'aire du compartiment auquel elle appartient (ici, le compartiment antérieur, zone de formation endostée, image du bas).

g. Mesures effectuées pour déterminer l'effet de la vibration

La vitesse du drift est propre à chaque individu car elle est liée à la forme initiale de l'os (épaisseur, courbure et position spatiale des compartiments antérieur et postérieur) et à son point d'équilibre quasi-final. De ce fait, l'étude de l'effet d'un régime mécanique qui dure plusieurs semaines, comme notre protocole de vibration, nécessite de trouver pour chaque souris un contrôle interne de sa dynamique propre. Pour ce faire, nous avons normalisé les aires formées pendant les semaines de vibration par l'aire formée pendant la semaine précédant le début du protocole (délimitée par les injections aux semaines 7 et 8) et nommée ici semaine 0 (S.0) comme illustré dans la figure 28. Les semaines durant lesquelles a lieu la vibration (de la S8 à la S14) seront donc les semaines S1 à S6.

L'avantage technique de cette normalisation est que chaque tranche d'os cortical possède un contrôle interne de sa dynamique. De ce fait, même si les coupes ne sont pas positionnées exactement au même endroit entre les souris (les coupes d'os cortical non inclus font souvent 300 à 400 µm d'épaisseur, ce qui peut induire des variabilités dans les positionnements), la normalisation par une référence temporelle permet de limiter des biais introduits lors de la réalisation des coupes. Ce type de normalisation sera aussi employé pour comparer les génotypes entre eux à l'état de base. Il servira à définir l'évolution dans le temps de leur vitesse d'apposition corticale, endostée et périostée.

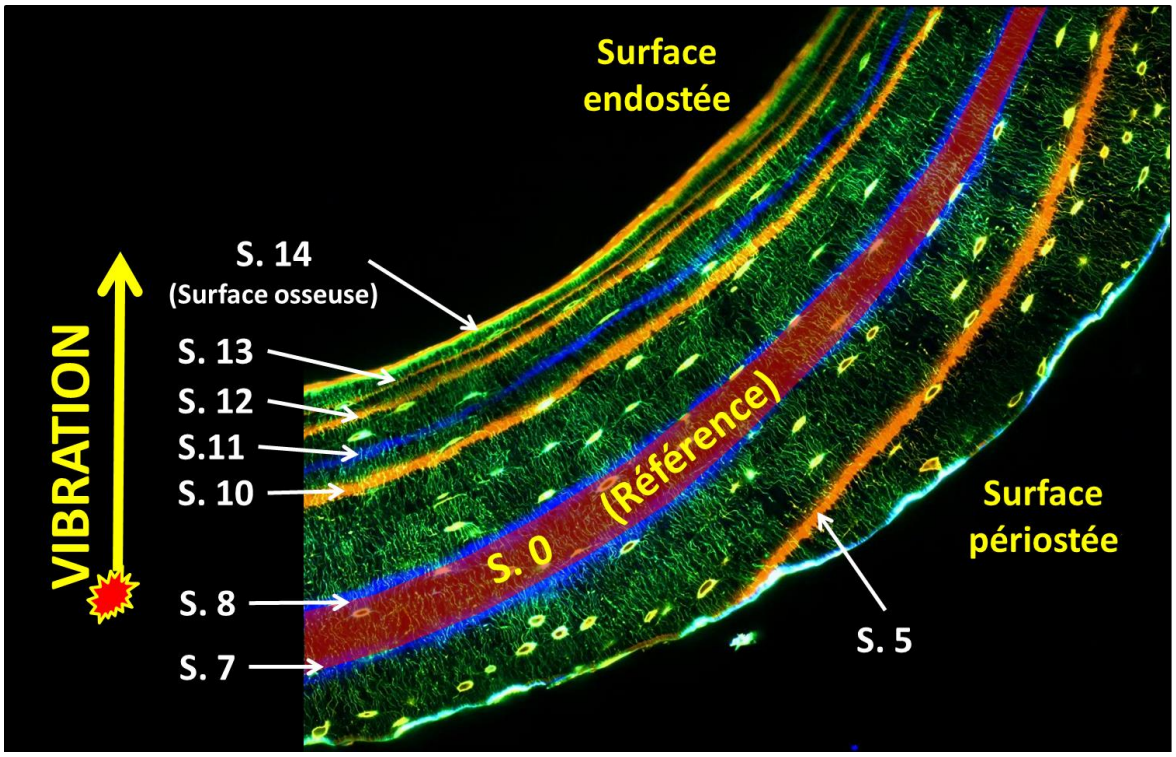


Figure 28 : Illustration de la normalisation des aires de formation. L'image représente un fragment de la partie antérieure de l'os cortical, avec une formation sur le côté endosté. Les lignes d'injections de rouge d'alizarine (en orange) et de calcéine (en bleu) sont identifiées par le moment où ils ont été injecté en semaine d'âge (noté S.). Les injections ont été réalisées aux semaines 5, 7, 8, 10, 11, 12 et 13. La vibration a débuté à la semaine 8 et s'est terminée à la semaine 14 (bord osseux). L'aire déposée entre les semaines 7 et 8 a servi de référence pour la normalisation des aires d'os déposées pendant le régime vibratoire. Cette référence a été nommée S0 (semaine 0).

h. Analyse des réseaux lacuno-canaliculaires

Etant donné que les lignes de formation délimitent des populations d'ostéocytes d'âges distincts et connus, nous avons procédé tout d'abord à l'analyse de la dynamique de formation, puis en se basant sur les résultats obtenus nous avons choisi la manière dont le réseau lacuno-canaliculaire serait compartimenté pour être analysé par tranches d'âge. Le choix des zones analysées a été déterminé par les résultats de l'étude de la dynamique d'apposition dans le compartiment antérieur, comme détaillé dans la partie Résultat. Nous allons décrire ici un exemple d'application des analyses sur un réseau lacuno-canaliculaire formé à un moment donné de l'expérience. Les grandes étapes du protocole sont illustrées dans la figure 29.

Brièvement, dans le logiciel ImageJ, l'aire du réseau d'intérêt a été définie et isolée du reste de l'image. Une segmentation a ensuite été appliquée via l'outil Trainable Weka Segmentation en définissant trois catégories : les lacunes, les canalicules et un fond (background). L'apprentissage du logiciel pour distinguer ces trois structures a été fait manuellement puis sauvegardé et appliqué pour tous les réseaux analysés. Une fois la segmentation réalisée, une « probability map » a été générée à partir de laquelle ont été extraites les lacunes et les canalicules séparément, qui ont été binarisés ensuite, puis analysées. Les paramètres générés pour les lacunes sont :

- la densité des lacunes (nombre de lacunes par surface osseuse, N.Lc/B.Ar, en lacunes/μm^2),
- l'aire lacunaire moyenne (Lc.Ar, en μm^2),
- la fraction lacunaire (Lc.Frac.Ar, en %) qui dépend à la fois du nombre et l'aire moyenne des lacunes,
- l'axe majeur lacunaire (Lc.Major Axis, en µm) qui est le grand axe des lacunes sur une coupe transversale et qui correspond à leur largeur,
- l'axe mineur lacunaire (Lc.Minor Axis, en µm) qui est le petit axe des lacunes sur une coupe transversale et qui correspond à leur épaisseur,
- la rondeur des lacunes (Lc.Round), sans unité et allant de 0 à 1, avec Lc.Round = (4*Lc.Ar)/(π*Lc. Major Axis^2).

Pour les canalicules, suite à la binarisation, un calcul d'aire est effectué, donnant donc la fraction d'aire canaliculaire (Cn.Frac.Ar). Ensuite les images sont squelettisées (« skeletonized ») en répartissant les pixels du signal présent sur l'image en 3 catégories (Figure 29) :

- Les « slabs pixels » (orange) : pixels possédant exactement deux pixels voisins et qui représentent les branches des canalicules.
- Les « junction pixels » (violet) : pixels possédant plus de deux pixels voisins et qui correspondent aux jonctions.
- Les « end-point pixels » (bleu) : pixels possédant moins de deux pixels voisins et sont les extrémités.

Ces éléments permettent ensuite de calculer divers paramètres décrivant les canalicules en les normalisant par l'aire du réseau canaliculaire (Cn.Ar) :

- nombre de branches (Cn.N/Cn.Ar),
- nombre de jonctions (Cn.Jun/Cn.Ar),
- longueur des branches (Cn.Le/Cn.Ar).

Les régions d'intérêt ont été définies manuellement pour chaque image de chaque stack (6 images) de chaque souris. La procédure est détaillée dans l'annexe méthodologique **V) E**. Ensuite les procédures de segmentation et d'analyses ont été effectuées de manière automatisées par la programmation de Macros Image J selon un protocole élaboré dans notre laboratoire (Peuriere, 2021). Ces macros sont présentes dans les annexes méthodologiques **V) F** et **V) G**, pour la segmentation et les analyses, respectivement. A la fin, pour chaque souris, les données des 6 images d'un stack ont été moyennées, donnant donc une valeur moyenne par paramètre par souris.

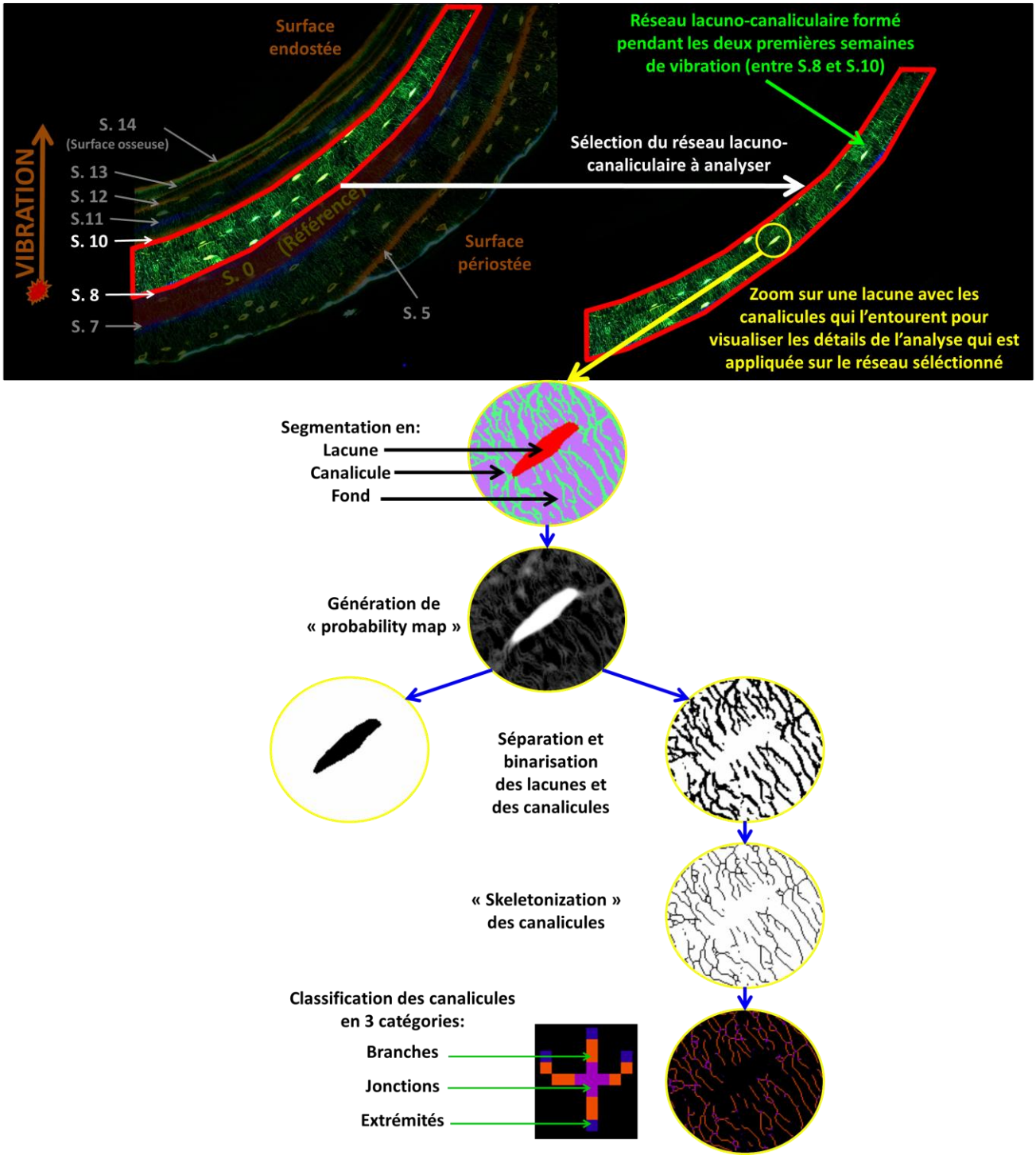


Figure 29 : Principales étapes du protocole d'analyse du réseau lacuno-canaliculaire formé durant les deux premières semaines de vibration.

i. Statistiques

Les courbes d'évolution des cinétiques de formation ont été comparées deux à deux avec le test *F* de l'ANOVA 2. Dans les conditions contrôles, la comparaison a été effectuée entre le groupe WT et chaque mutant et entre les DKO et les autres mutants en se basant sur les facteurs génotype et temps. Dans les conditions vibrées, la comparaison a été réalisée pour chaque génotype entre le groupe contrôle (CT) et le groupe vibré (VB) en se basant sur les facteurs vibration et temps. Les paramètres du réseau lacuno-canaliculaires ont été comparés entre les différents groupes avec le test *U* de Mann-Whitney.

3. Résultats

a. Dynamiques de base des différents génotypes dans le compartiment antérieur de l'os cortical

Les injections successives conduisent à la formation de lignes fluorescentes permettant d'identifier les aires osseuses déposées à des stades successifs de l'expérience (Figure 30). La coupes des os des souris DKO montre la porosité importante du compartiment postérieur, qui se situe dans la zone d'os primaire (os cortical primo-formé au cours du développement embryonnaire) rémanent (Shipov et al., 2013), qui fait chez ces mutants l'objet d'un remodelage intra-cortical intense ((Bouleftour et al., 2019), et figure S1).

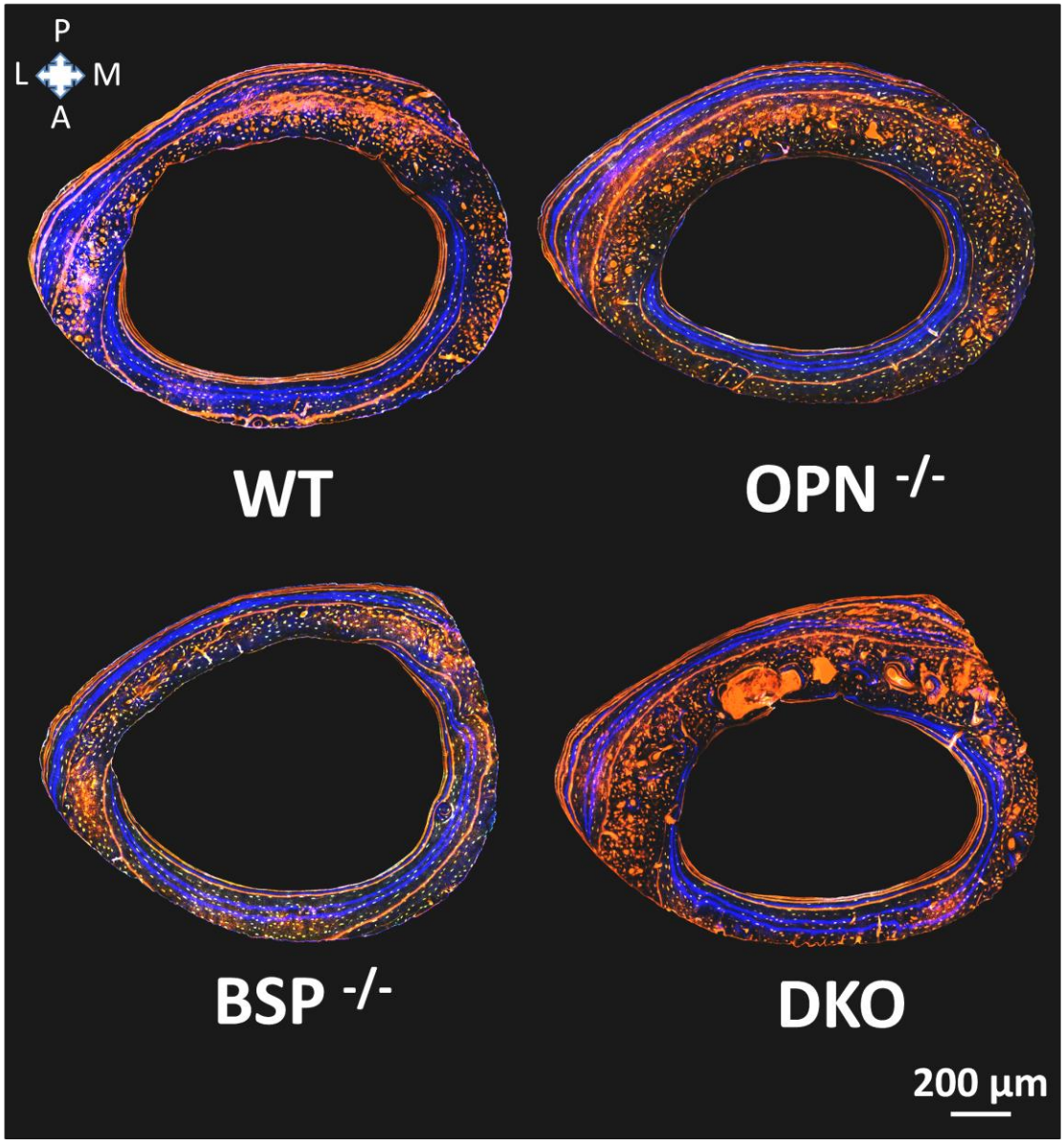


Figure 30 : Exemple de coupes d'os corticaux de fémurs de souris WT, OPN$^{-/-}$, BSP$^{-/-}$ et DKO ayant subi le protocole de multimarquage.

Concernant la formation endostée, les mesures d'aires déposées montrent que les souris $OPN^{-/-}$ possèdent une activité de formation plus basse que celle des souris WT ($p = 7*10^{-3}$, ANOVA 2 (génotypes*temps), Figure 31A). A l'inverse, les souris $BSP^{-/-}$ et DKO possèdent des activités de formation endostée plus élevées que les souris WT ($p = 6*10^{-6}$ pour les $BSP^{-/-}$; $p = 1*10^{-3}$ pour les DKO). Il n'y a cependant pas de différence entre les souris $BSP^{-/-}$ et DKO. Ces résultats sont retrouvés quand les valeurs d'aire d'os déposés sont cumulées au cours du temps (Figure 31B).

La normalisation par l'aire du compartiment antérieur met en évidence les mêmes différences, avec des valeurs plus basses que les WT chez les $OPN^{-/-}$ ($p = 4*10^{-6}$) et plus élevées pour les $BSP^{-/-}$ ($p = 2*10^{-20}$) et les DKO ($p = 3*10^{-5}$). Cette forme de présentation révèle cependant une formation relative plus importante chez les $BSP^{-/-}$ que chez les DKO (p =0,048, Figure 31C).

La normalisation des aires déposées sur les valeurs de la semaine S0 montre que les souris WT, $BSP^{-/-}$ et DKO gardent le même rythme d'accroissement cortical par rapport à la semaine S7-S8 tout au long de la période étudiée. Le rythme de dépôt diminue chez les $OPN^{-/-}$ ($p = 9*10^{-8}$ vs WT, Figure 31D), ce qui était suggéré par la courbe plus basse des $OPN^{-/-}$ dès S8-S10 sur le graphe 31A.

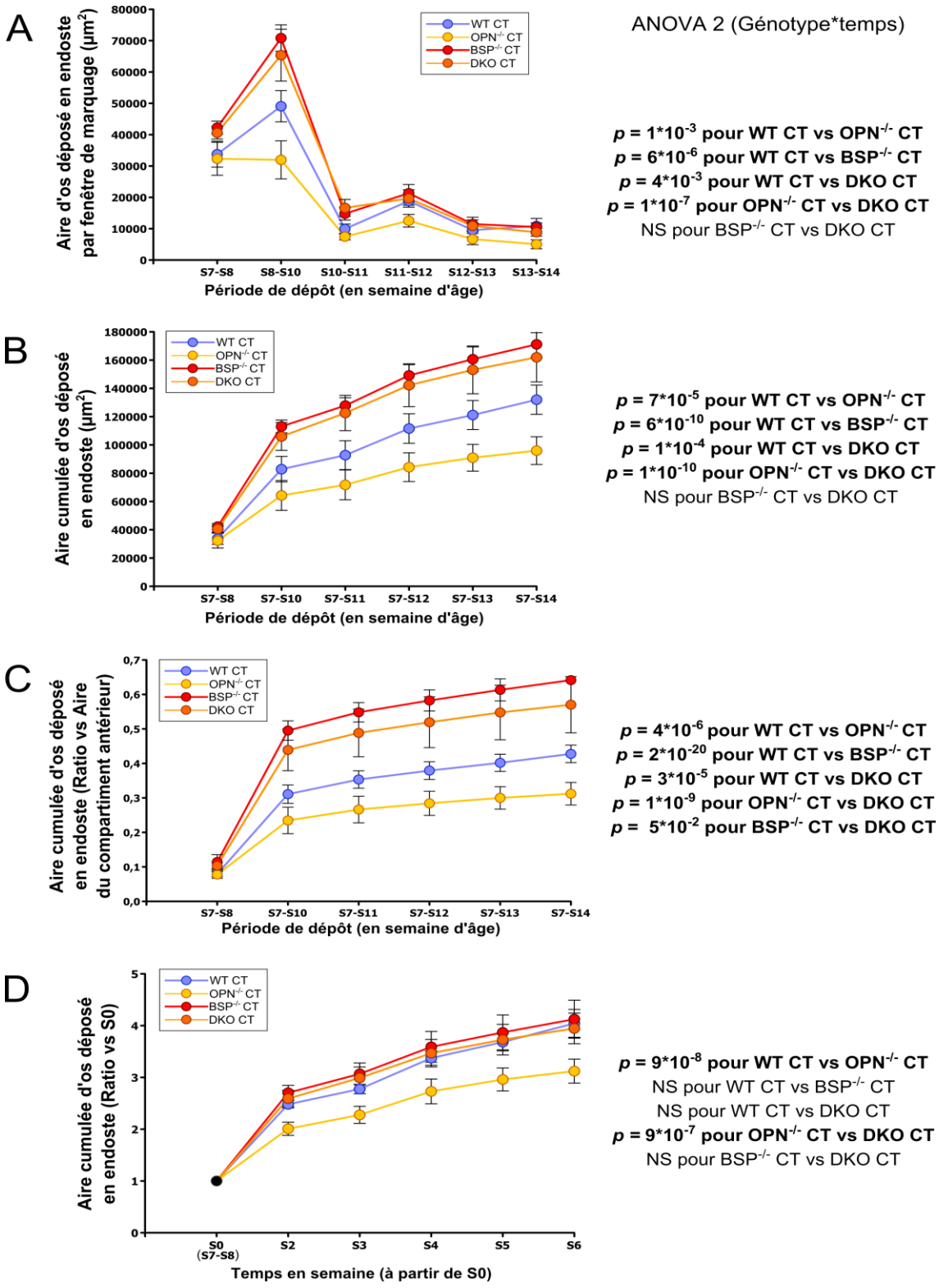


Figure 31 : Formation endostée des souris contrôle des génotypes WT, OPN$^{-/-}$, BSP$^{-/-}$ et DKO en valeurs brutes (A), en valeurs brutes cumulées (B), en valeurs cumulées normalisées par l'aire du compartiment antérieur (C) et normalisées par l'aire de la semaine S0 (D). A-C : Sx-Sy indique les semaines de vie où ont été injecté les marquages délimitant l'aire prise en compte ; D : Sx : semaine après S0. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ETM. Sur la droite, pour chaque graphique, les valeurs du test *F* de l'ANOVA 2 (en gras si p<0,05), n=6 souris / génotype.

b. Dynamiques de base des différents génotypes dans le compartiment postérieur de l'os cortical

Concernant la formation périostée, les valeurs maximales d'os déposé (Figures 32 A et B) montrent une activité plus faible que la formation endostée chez tous les génotypes à l'exception des $OPN^{-/-}$ qui possèdent une cinétique similaire entre les deux compartiments. Les mesures d'aires montrent que les souris DKO possèdent une activité de formation plus élevée que celle des souris WT ($p = 4*10^{-2}$, Figure 32A), $OPN^{-/-}$ ($p = 3*10^{-2}$) et $BSP^{-/-}$ ($p = 6*10^{-4}$). Ni les $OPN^{-/-}$ ni les $BSP^{-/-}$ ne sont différentes des souris WT. Ces résultats sont retrouvés avec les valeurs cumulées (Figure 32B).

La normalisation de ces résultats par l'aire du compartiment postérieur donne pour les souris $OPN^{-/-}$ des valeurs plus basses que les WT ($p = 1*10^{-4}$, Figure 32C) comme c'est le cas dans le compartiment antérieur. Les souris $BSP^{-/-}$ et DKO ne sont pas différentes des souris WT pour ce paramètre.

La normalisation sur la semaine S0 montre que les souris $BSP^{-/-}$ sont les seules à être différentes des souris WT, avec un rythme d'apposition cortical plus bas ($p = 6*10^{-3}$ vs WT, Figure 32D), comme c'était le cas pour les souris $OPN^{-/-}$ au niveau du compartiment antérieur. Aucune différence n'est retrouvée entre les souris WT et les $OPN^{-/-}$ ou les DKO, soulignant une évolution similaire de la cinétique de formation de ces trois génotypes dans le compartiment postérieur (Figure 32D).

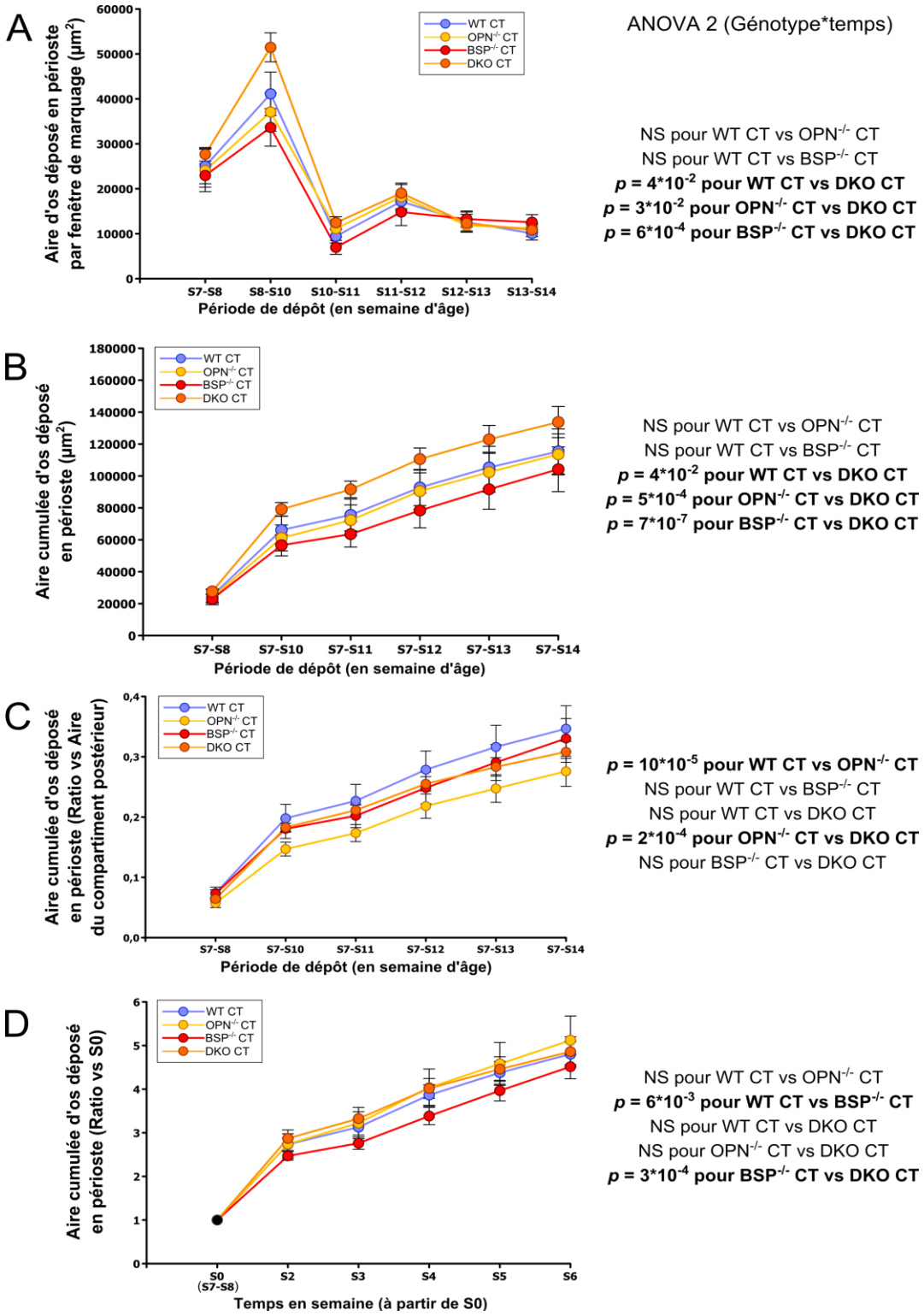


Figure 32 : Formation périostée des souris contrôle des génotypes WT, OPN$^{-/-}$, BSP$^{-/-}$ et DKO en valeurs brutes (A), en valeurs brutes cumulées (B), en valeurs cumulées normalisées par l'aire du compartiment postérieur (C) et normalisées par l'aire de la semaine S0 (D). A-C : Sx-Sy indique les semaines de vie où ont été injecté les marquages délimitant l'aire prise en compte ; D : Sx : semaine après S0. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ETM. Sur la droite, pour chaque graphique, les valeurs du test *F* de l'ANOVA 2 (en gras si p<0,05), n=6 souris / génotype.

c. Effet de la vibration du corps entier sur la formation osseuse corticale

Sous vibration, les souris WT et DKO n'ont pas modifié la vitesse d'apposition endostée au cours de l'expérience (Figure 33A et D), même si la courbe des DKO VB se situe au-dessus des contrôles. Au contraire, on observe un rythme d'apposition significativement plus lent chez les souris $OPN^{-/-}$ vibrées ($p = 2*10^{-2}$, Figure 33B) alors qu'il est plus élevé chez les $BSP^{-/-}$ vibrées ($p = 1*10^{-3}$, Figure 33C). De manière intéressante, la forme des courbes montre que les effets sur ces deux génotypes ne sont détectables qu'après 2 semaines de vibration. Dans le compartiment postérieur de l'os cortical, l'évolution de la vitesse d'apposition périostée au cours du temps n'a pas été affectée par le régime vibratoire, quel que soit le génotype (Figure S2).

Sur la base des observations de la dynamique endostée, nous avons décidé d'analyser le réseau lacuno-canaliculaire du compartiment antérieur, en le séparant en deux zones temporelles : le réseau formé pendant les deux premières semaines de vibration, et le réseau formé à partir de la troisième semaine et jusqu'à la fin du protocole.

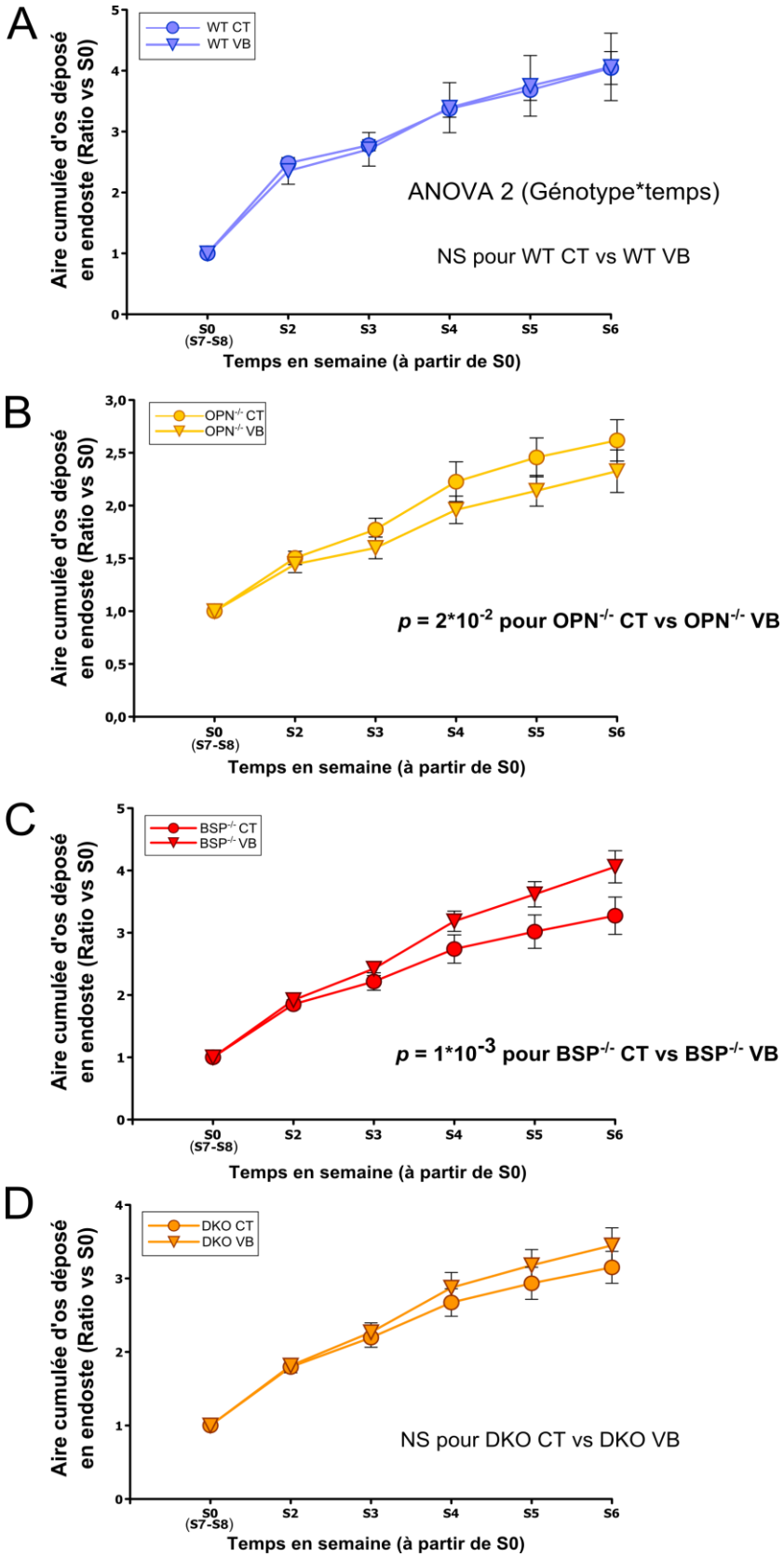


Figure 33 : Formation endostée cumulée, normalisée par l'aire de la semaine S0 (dernière semaine avant vibration), pour les souris WT, OPN$^{-/-}$, BSP$^{-/-}$ et DKO des groupes contrôles (CT) et vibrés (VB). Sx : semaine de vibration. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Sur la droite, pour chaque graphique, les valeurs du test *F* de l'ANOVA 2 (en gras si p<0,05), n=6 souris / génotype.

d. Effets de la vibration du corps entier sur le système lacuno-canliculaire.

Lacunes ostéocytaires

Toutes les souris mutantes présentent une densité lacunaire (Lc.N / B.Ar) plus élevée que les WT en S8-S10 (2 premières semaines de vibration, Figure 34). A S10-S14, ce paramètre diminue uniquement chez les mutants, les $OPN^{-/-}$ gardant une densité supérieure aux WT (p = 0,0104, Test U de Mann-Whitney), tandis que les valeurs des $BSP^{-/-}$ sont plus basses (p = 0,0040) et les DKO ne diffèrent pas des WT. La densité lacunaire n'a été affectée par la vibration chez aucun génotype dans la fenêtre S8-S10. De manière remarquable, les souris $OPN^{-/-}$ vibrées diminuent leur densité lacunaire à S10-S14 sous vibration (p = 0,0373) alors que les souris $BSP^{-/-}$ l'augmentent (p = 0,0249), sans aucun effet observé chez les WT et les DKO.

Dans tous les génotypes, l'aire moyenne des lacunes est supérieure dans le réseau formé au cours des quatre dernières semaines (S10-S14) à ce qu'elle est dans celui formé dans les deux premières semaines (S8-S10, figure 34). L'aire lacunaire moyenne du réseau formé en S8-S10 est supérieure chez les $BSP^{-/-}$ (p = 0,0039) et les DKO (p = 0,0065) à celle des WT, et n'est pas différente chez les $OPN^{-/-}$. En S10-S14, il n'y a aucune différence entre les aires lacunaires des différents génotypes des groupes CT. Aucun effet de la vibration sur l'aire lacunaire n'est observé dans les deux premières semaines de vibration chez tous les génotypes. De manière intéressante, dans les 4 dernières semaines de vibration, les aires des lacunes diminuent chez les souris $OPN^{-/-}$ (p = 0,0373) et augmentent chez les souris $BSP^{-/-}$ (p = 0,0249), alors qu'aucun effet n'est observé pour les WT et les DKO.

Les modifications sous vibration du réseau formé à S10-S14 pour les souris $OPN^{-/-}$ et $BSP^{-/-}$ sont retrouvées pour la fraction lacunaire (figure S3) qui diminue sous vibration chez les souris $OPN^{-/-}$ (p = 0,0104) alors qu'elle augmente chez les $BSP^{-/-}$ (p = 0,0373).

La longueur de l'axe majeur lacunaire à S8-S10 est supérieure chez les $BSP^{-/-}$ à celle des WT (p = 0,0394, Figure 35). Ce paramètre augmente chez tous les génotypes à S10-S14 et n'est pas affecté par le régime vibratoire. La longueur de l'axe mineur à S8-S10 est aussi supérieure chez les $BSP^{-/-}$ (p = 0,0394) et les DKO (p = 0,0394) aux valeurs WT (figure 35). A S10-S14, plus aucune différence n'est observée pour ce paramètre entre les génotypes, mais une augmentation a lieu chez les souris $BSP^{-/-}$ sous vibration (p = 0,0249, Figure 35).

Les modifications des axes majeur et mineur peuvent affecter la rondeur des lacunes. Ainsi pour les DKO, étant donné que seul l'axe mineur est supérieur aux WT à S8-S10, leur lacunes sont de ce fait plus rondes que celles des WT (p = 0,0104, figure S3). L'augmentation de l'axe mineur chez les souris

BSP$^{-/-}$ sous vibration à S10-S14 a induit une augmentation en tendance de la rondeur de leur lacunes (p = 0,0782, figure S4).

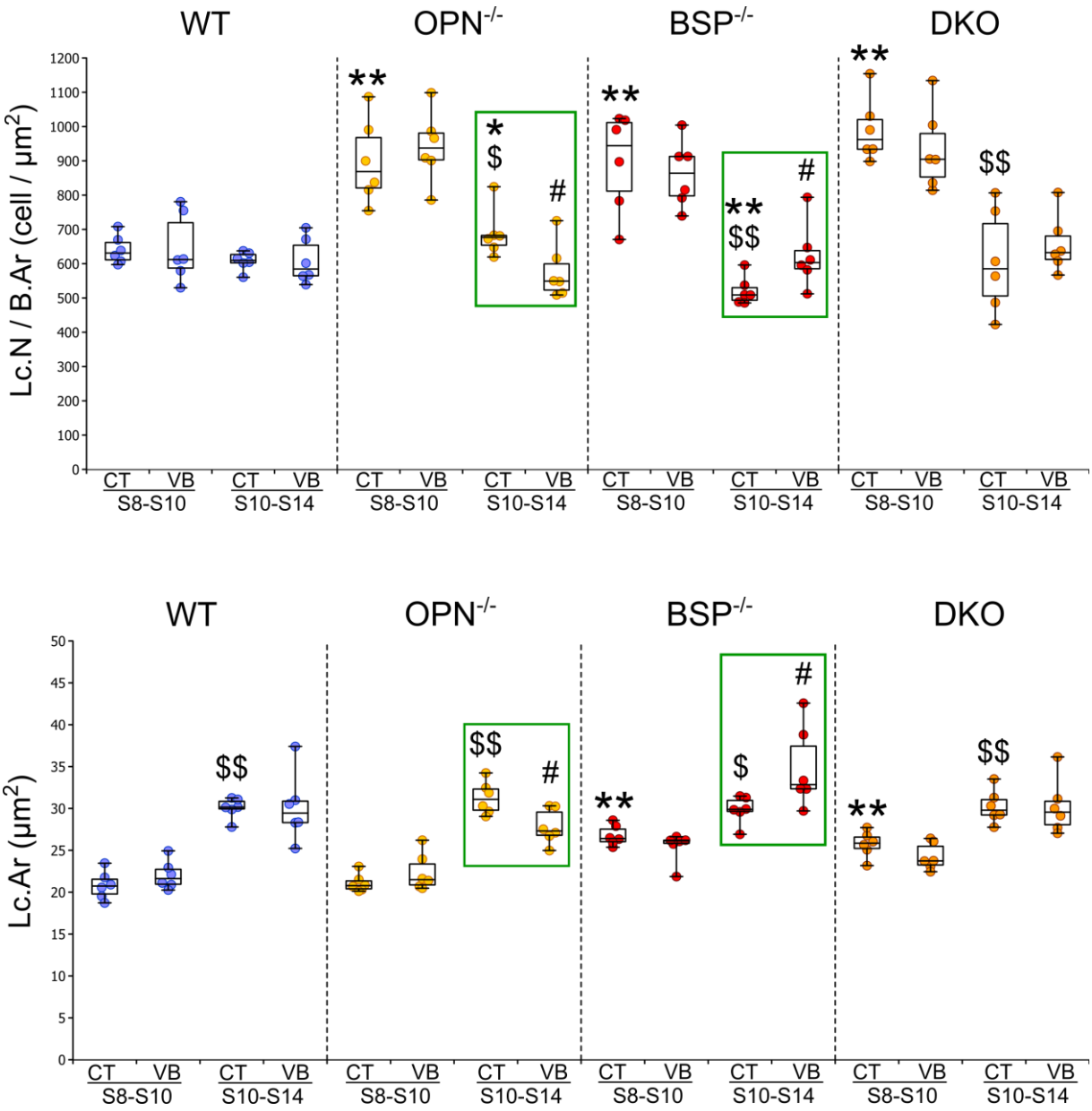


Figure 34 : Densité (Lc.N/B.Ar) et aire moyenne (Lc.Ar) des lacunes ostéocytaires dans le compartiment cortical antérieur de souris WT, OPN$^{-/-}$, BSP$^{-/-}$ et DKO des groupes contrôle (CT) et vibré (VB), mesurées dans l'os formé au cours des deux premières semaines (S8-S10) et des quatre dernières semaines (S10-S14) du protocole WBV. *p<0,05 ;**p<0,01 entre mutants et WT de la même période, $^{\$}p$<0,05 ; $^{\$\$}p$<0,01 entre S8-S10 et S10-S14 pour les CT de chaque génotype, $^{\#}p$<0,05 entre CT et VB pour chaque génotype, test U de Mann-Whitney, n=6 souris/groupe. Les cadres verts soulignent les effets de la WBV.

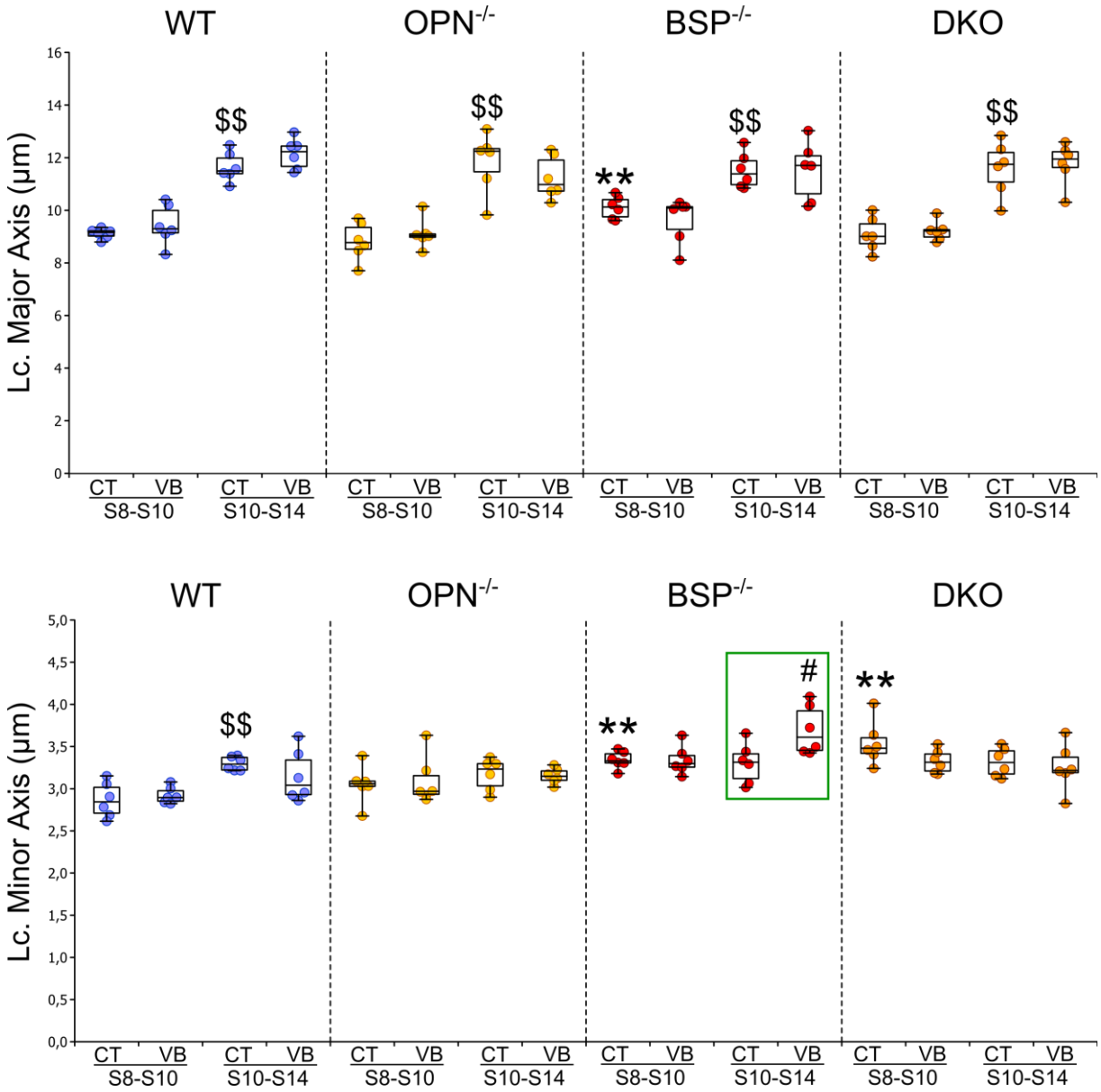


Figure 35 : Axe majeur (Lc. Major Axis) et axe mineur (Lc Minor Axis) des lacunes ostéocytaires dans le compartiment antérieur de souris WT, OPN$^{-/-}$, BSP$^{-/-}$ et DKO groupes contrôle (CT) et vibré (VB), mesurées dans l'os formé au cours des deux premières semaines (S8-S10) et des quatre dernières semaines (S10-S14) du protocole WBV. ***p*<0,01 entre mutants et WT de la même période, $^{\$\$}p$<0,01 entre S8-S10 et S10-S14 pour les CT de chaque génotype, $^{\#}p$<0,05 entre CT et VB pour chaque génotype, test *U* de Mann-Whitney, n=6 souris/groupe. Le cadre vert souligne l'effet de la WBV.

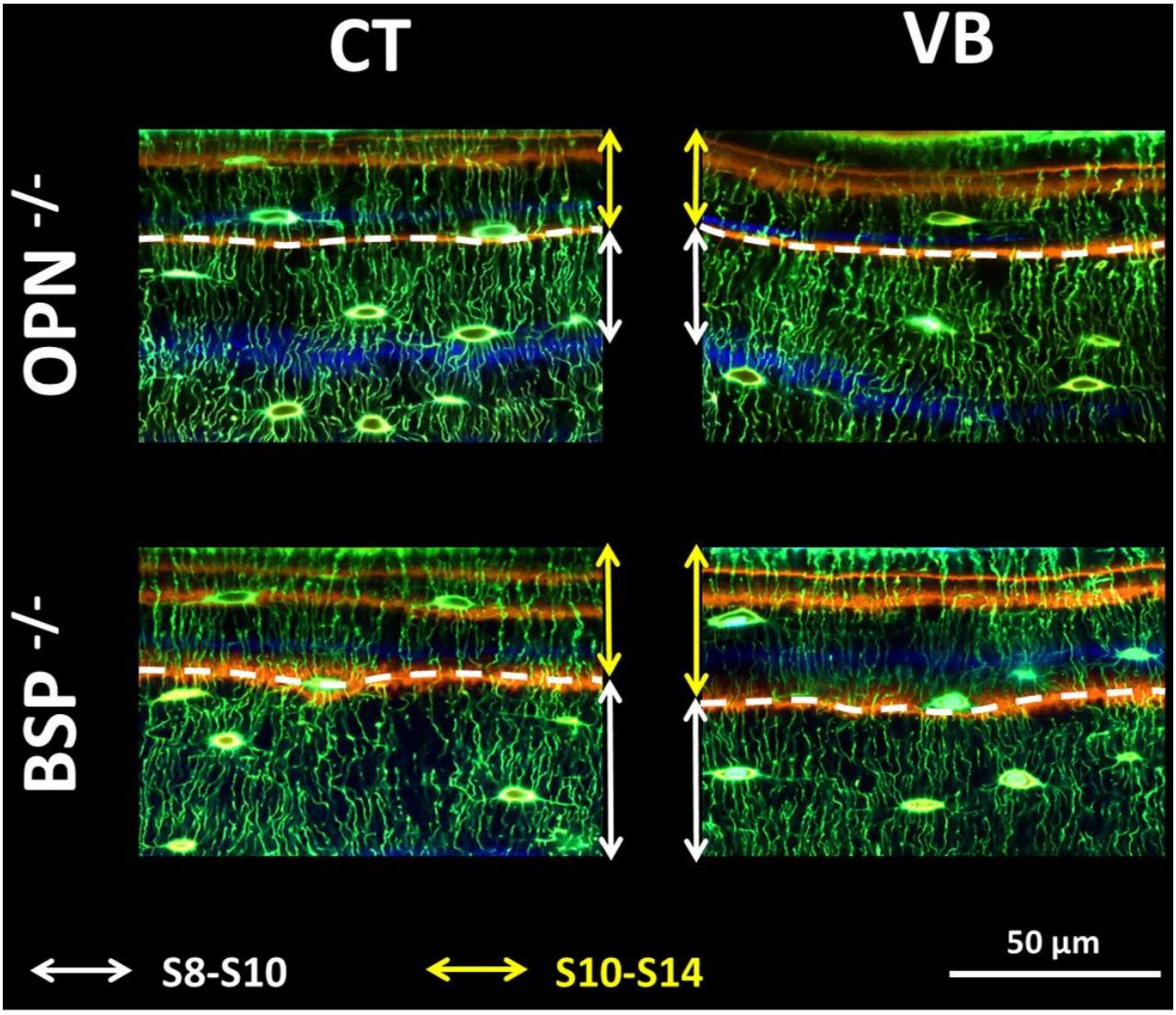


Figure 36 : Images d'une partie du réseau lacuno-canaliculaire des souris $BSP^{-/-}$ et $OPN^{-/-}$ en condition contrôle (CT) et vibrée (VB). Pour chaque image, la ligne blanche discontinue indique la position de la ligne d'injection S10 réalisée après 2 semaines de WBV. Les doubles flèches blanches et jaunes indiquent les périodes S8-S10 et S10-S14, respectivement.

Réseau canaliculaire

La fraction d'aire du réseau canaliculaire (Cn.Frac.Ar) est inférieure en S10-S14 aux valeurs de la période S8-S10 dans tous les génotypes (figure 37). Aucune différence entre génotype ou sous vibration n'est observée pour ce paramètre. Le nombre de canalicules (Cn.N / Cn.Ar) est supérieur chez tous les génotypes à S10-S14 par rapport à S8-S10. De manière intéressante les DKO diminuent leur nombre de canalicules dans les deux premières semaines de vibrations (p = 0,0104). De même pendant la même période ces souris diminuent sous vibration le nombre de jonctions entre canalicules (Cn.Junc / Cn.Ar, p = 0,0036, Figure 37), un paramètre qui est stable à travers tous le compartiment dans tous les génotypes.

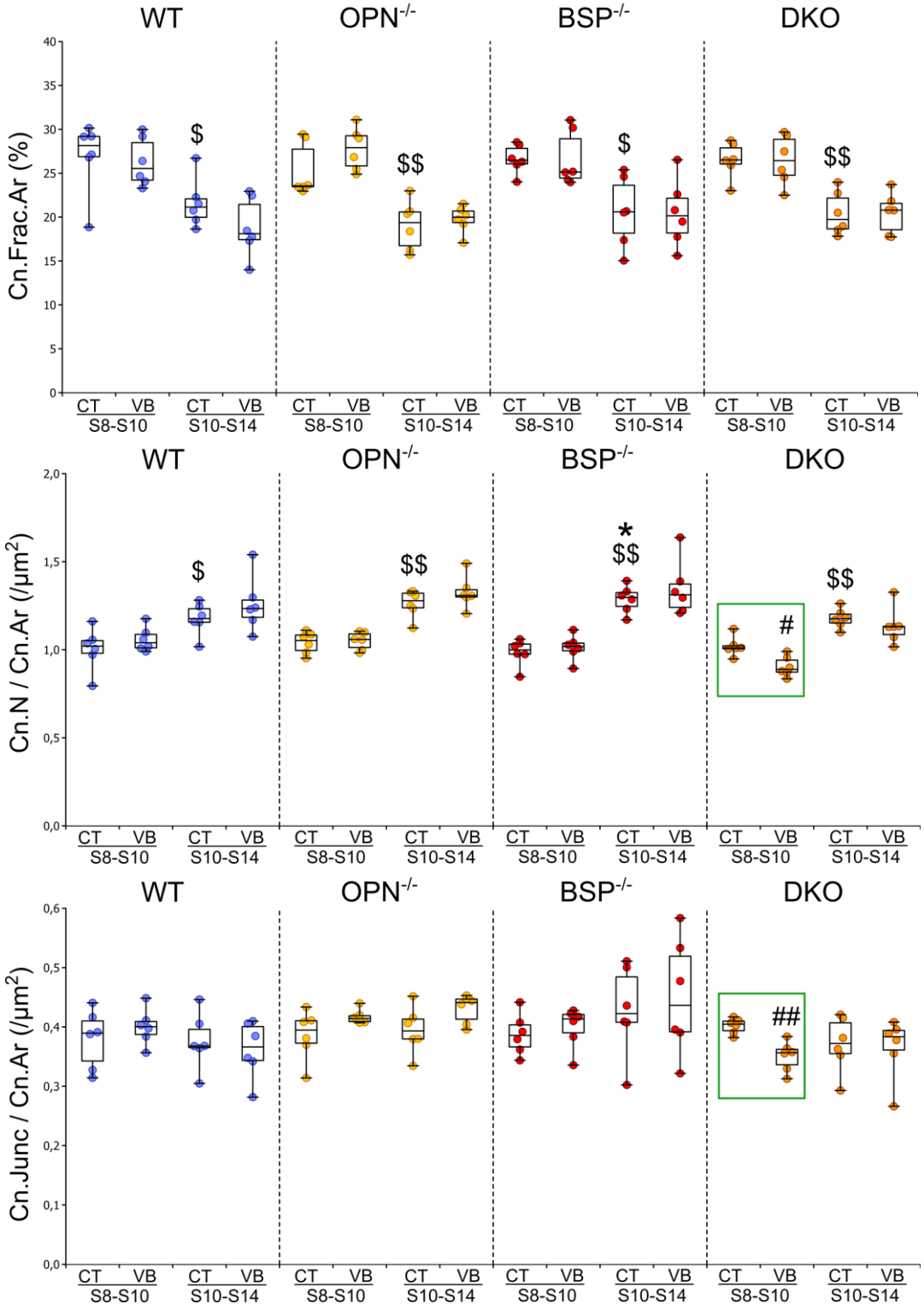


Figure 37 : Fraction d'aire canaliculaire (Cn.Frac.Ar), nombre de canalicule (Cn.N / Cn.Ar) et nombre de jonction canaliculaire (Cn.Junc / Cn.Ar) par aire canaliculaire dans le compartiment antérieur de souris WT, OPN$^{-/-}$, BSP$^{-/-}$ et DKO groupes contrôle (CT) et vibré (VB), mesurées dans l'os formé au cours des deux premières semaines (S8-S10) et des quatre dernières semaines (S10-S14) du protocole WBV. *p<0,05 entre mutants et WT de la même période, $^{\$}p$<0,05 ; $^{\$\$}p$<0,01 entre S8-S10 et S10-S14 pour les CT de chaque génotype, $^{\#}p$<0,05 ; $^{\#\#}p$<0,01 entre CT et VB pour chaque génotype, test *U* de Mann-Whitney, n=6 souris/groupe. Les cadres vert soulignent les effets de la WBV.

4. Discussion

Le multimarquage de l'os cortical chez la souris a permis de caractériser le modelage de manière compartimentée, mais aussi de mesurer l'effet des contraintes mécaniques sur l'évolution de ce modelage. Ainsi avec nos modèles de souris génétiquement modifiées, nous avons démontré par cette expérience que la délétion de l'OPN, de la BSP ou des deux affecte de manière distincte le modelage. Ceci souligne non seulement le rôle de ces deux protéines dans la dynamique de modelage mais aussi leur interaction dans ce processus.

La dynamique du compartiment antérieur de l'os cortical est globalement plus importante que celle du compartiment postérieur (Figures 31 et 32), comme le suggérait la distribution de l'os primaire intra-cortical rémanent (figure 30), qui est concentré sur la partie postérieure de la section osseuse, au modelage de toute évidence moins rapide. A cet égard, la présence de l'os primaire dans le compartiment postérieur peut expliquer les discordances entre les Figures 32B et 32C, sa contribution étant plus importante chez les $OPN^{-/-}$ et les DKO, et plus basse que les WT chez les $BSP^{-/-}$, comme l'a montré un travail récent du laboratoire en collaboration avec l'Unité 1033, dans le cadre de l'ANR Mouse_Kosto (Figure S6).

De manière globale, l'élément important pour les souris $OPN^{-/-}$ est un taux de formation osseuse plus faible au moins dans le compartiment antérieur, et de l'ordre de celle des WT dans le compartiment postérieur. De plus, dans le compartiment antérieur, la formation endostée des $OPN^{-/-}$ présente une décroissance du dépôt d'os avec le temps qui est plus importante que tous les autres génotypes. Cependant l'épaisseur moyenne de leur os cortical est plus élevée que celle des WT ((Bouleftour et al., 2019), et nos propres résultats, Tableau S4, Page 84) ce qui suggère que l'activité de résorption est elle aussi bien plus faible dans ce génotype. A l'inverse des $OPN^{-/-}$, les souris $BSP^{-/-}$ possèdent les épaisseurs corticales les plus fines parmi les 4 génotypes, ce qui avait été interprété auparavant comme reflétant une formation plus basse, en accord avec l'histomorphométrie de l'os trabéculaire à 4 mois (Malaval et al., 2008). A notre surprise, les marquages séquentiels révèlent au contraire un turnover élevé dans le compartiment antérieur de l'os cortical (formation intense, et sans doute résorption intense telle qu'évaluée par les surfaces ostéoclastiques en fin d'expérience dans la première étude, Cf. Tableau S4, Page 84). Les DKO quant à eux présentent dans le compartiment antérieur une activité de formation identique aux $BSP^{-/-}$ couplée à une activité de résorption plus basse (Cf. Tableau S4, Ps. Oc.Pm/BPm, Page 84) alors que dans le compartiment postérieur elles possèdent une activité de formation plus élevée que les $BSP^{-/-}$ avec une activité de résorption identique (Cf. Tableau S4, Ec. Oc.Pm/BPm, Page 84). L'ensemble de ces activités différentes entre les compartiments converge vers le fait que les DKO possèdent des corticales plus épaisses que les $BSP^{-/-}$.

Comme rappelé dans la partie bibliographique, la littérature rapporte un défaut d'activité de résorption des ostéoclastes $OPN^{-/-}$ et $BSP^{-/-}$. Cependant, une activité accrue de résorption *in vivo* sous défi expérimental a été décrite pour les souris $BSP^{-/-}$ (perte osseuse sous décharge du train arrière (Malaval

et al., 2008), et sous ovariectomie (Wade-Gueye et al., 2010)), et $OPN^{-/-}$ (Nos résultats présents sous HG et WBV, Tableau S2, page 82, Tableau S4, page 84). Les ostéoclastes des DKO ayant de plus une activité de résorption même plus intense que celle des WT (Bouleftour et al., 2019), il est clair que la question de l'impact de ces deux protéines sur le lignage ostéoclastique, des complémentarités et des compensations fonctionnelles possibles (en particulier *in vivo*), doit être réexaminée.

L'analyse de la dynamique corticale sous vibration a révélé que les effets sur les cinétiques des $OPN^{-/-}$ et $BSP^{-/-}$ semblent s'amorcer au-delà des deux premières semaines de vibration. Il en est de même pour l'impact de ce régime sur le réseau lacuno-canaliculaire (avec l'exception des DKO, voir plus bas). Il est probable que la perception du signal soit faite immédiatement mais que le recrutement, la prolifération, la maturation et la différenciation des ostéoblastes se soient déroulés sur plusieurs semaines. De fait, la durée de vie active d'un ostéoblaste de souris a été estimée à ~12 jours (Weinstein et al., 1998). Il est également possible que chez les mutants la vibration ait modifié la durée de vie des ostéoblastes et/ou la probabilité de leur recrutement comme ostéocytes (ou de leur entrée en apoptose), ce qui se serait retrouvé dans la densité lacunaire après un certain délai. Ceci ne veut pas nécessairement dire que les ostéocytes déposés durant les deux premières semaines n'ont pas un rôle important à jouer, en termes de réception et transduction du signal mécanique, et de signalisation paracrine.

Cependant, la question se pose de l'effet de leur densité sur la réponse ostéogénique, et on pourrait se demander si l'augmentation de la densité lacunaire des $BSP^{-/-}$ sous vibration n'a pas potentialisé l'augmentation de la formation. Dans les deux premières semaines du protocole vibratoire, les souris $BSP^{-/-}$, $OPN^{-/-}$ et DKO présentent des densités lacunaires élevées par rapport aux souris WT. Cependant, les trois mutants ont présenté des réponses très différentes. Ceci peut suggérer que la densité ne constitue pas un paramètre crucial pour déterminer les effets de la contrainte mécanique. Etant donné aussi que la région qui a changé de dynamique sous vibration (S10-S14) présente aussi une modification de la densité lacunaire, il est probable que l'architecture soit de ce fait une conséquence de la dynamique et ne constitue pas la principale cause. Il y a donc une composante régulatrice affectant la réponse, qui est liée aux extinctions géniques et indépendante de la densité cellulaire. A l'appui de cette hypothèse, une étude *in vivo* chez le rat a montré que des activités de formations induites par stimulation mécanique ne sont pas dépendantes de la densité ostéocytaire locale dans l'os trabéculaire vertébral (Cresswell et al., 2018).

L'analyse de l'expression génique présentée dans le premier article a été réalisée en fin d'expérimentation, et ne montre pas d'effets sur les marqueurs de formation chez les souris $OPN^{-/-}$ et $BSP^{-/-}$. Il serait intéressant et même crucial de répéter l'expérience de WBV et de l'arrêter après seulement deux ou trois semaines de vibration, pour évaluer les marqueurs osseux des différents génotypes, mais aussi élargir l'analyse par une approche de multi-criblage, pour rechercher les voies régulatrices impliquées, comme discuté dans la partie **III** « Discussion générale et perspectives ».

Un autre aspect important de l'architecture du réseau lacuno-canaliculaire est l'aire moyenne des lacunes car, comme la densité, ce paramètre diminue chez les $OPN^{-/-}$ vibrés et augmente chez les $BSP^{-/-}$ après deux semaines de vibration. L'aire lacunaire de base est plus élevée dans tous les génotypes dans le réseau S10-S14 que dans le réseau S8-S10, ce qui implique que des lacunes nouvellement formées sont plus larges que des lacunes anciennes. Ceci pourrait refléter le fait que la minéralisation du réseau S10-S14 est moins avancée que celle du réseau S8-S10. Le fait que l'aire lacunaire chute chez les $OPN^{-/-}$ à partir de deux semaines de vibration peut être liée à une activité de formation osseuse plus lente, laissant le temps aux lacunes de se minéraliser et/ou permettant de mobiliser davantage de calcium et de phosphate sur ces sites. Inversement, l'augmentation de l'aire lacunaire des $BSP^{-/-}$ après deux semaines de vibration peut refléter l'augmentation de la vitesse de formation. L'aire lacunaire élevée des souris $BSP^{-/-}$ et DKO en S8-S10 évoque aussi la minéralisation diminuée dans ces génotypes. Une étude visant à étudier la mécanosensibilité en lien avec la taille des lacunes a démontré par des contraintes appliquées sur tibia *ex vivo* que les souris femelles lactantes, qui ont des lacunes plus larges que des souris vierges, présentent une réponse ostéogénique plus importante à la suite de l'application d'un stimulus mécanique (Hemmatian, Jalali, et al., 2018). Cependant, l'insensibilité des DKO qui ont, comme les $BSP^{-/-}$, des lacunes plus larges que celles des WT (en S8-S10), démontre que ce paramètre ne peut être considéré comme suffisant pour expliquer la réponse ostéogénique des $BSP^{-/-}$.

Dans le même ordre d'idée, l'élargissement des lacunes des souris $BSP^{-/-}$ sous vibration semble favoriser un arrondissement des ostéocytes puisque c'est uniquement l'axe mineur qui augmente à partir de deux semaines de vibration. Il a été proposé que les ostéocytes ronds ont une meilleure mécanosensibilité que les ostéocytes plats (Bacabac et al., 2008). En effet, *in vitro,* des cellules MLO-Y4 arrondies (partiellement adhérentes ou suspendues) possèdent une rigidité ainsi qu'un seuil de réponse par production de NO inférieurs aux cellules de forme plates. Cependant, les souris DKO présentent des lacunes plus arrondies que tous les autres génotypes dans la période S8-S10 et n'ont pas montré une réponse ostéogénique. Il est donc possible que malgré une architecture du réseau des DKO théoriquement propice à une bonne mécanosensibilité (lacunes larges, arrondies et nombreuses), l'absence concomitante de BSP et d'OPN altère la réponse à la stimulation mécanique.

Les canalicules n'ont pas montré un même profil de variation sous vibration que les lacunes étant donné qu'aucune modification n'est détectable chez les souris $BSP^{-/-}$ et $OPN^{-/-}$ vibrées. Cependant il est intéressant de noter que les souris DKO présentent une chute du nombre de canalicules et de jonctions dans le réseau formé durant les deux premières semaines de vibrations - le seul paramètre, et le seul génotype, ayant montré un effet pendant cette fenêtre expérimentale. Ceci peut suggérer un effet délétère rapide de la vibration en l'absence de BSP et OPN, qui a peut être amené à une réduction de la mécanosensibilité chez les DKO.

Concernant les phénotypes de base des souris mutantes, il est important de noter que les souris $BSP^{-/-}$ et DKO présentent plusieurs points communs avec les souris *hyp* qui sont utilisées pour étudier les

symptômes de l'hypophosphatémie lié à l'X. En effet, toutes ces souris présentent une hypominéralisation mais aussi des lacunes plus larges et plus denses. Comme évoqué précédemment, les souris $BSP^{-/-}$ et DKO présentent une surexpression de la protéine MEPE qui constitue une source majeure d'ASARM, un peptide inhibiteur de la minéralisation. Les souris $DMP1^{-/-}$, qui sont hypominéralisées, surexpriment également MEPE (Jani et al., 2016), voir discussion dans Bouleftour et al., 2019.

En conclusion, l'ensemble de ces données a permis de comprendre les dynamiques osseuses des 4 génotypes en mettant en évidence une cinétique de croissance différente. Cette expérience a aussi permis une meilleure compréhension des effets de la vibration sur les paramètres de formation corticale, en particulier en termes de cinétique, et notamment chez les souris $BSP^{-/-}$ et $OPN^{-/-}$. L'analyse du réseau lacuno-canaliculaire a montré quant à elle des différences de base entre les lignées qui rentrent dans la caractérisation de leur phénotype, mais aussi une vision temporelle soulignant les différences entre un réseau jeune (S7-S8) et un plus ancien (S8-S10) et les effets de la vibration sur leurs caractéristiques.

5. Données supplémentaires

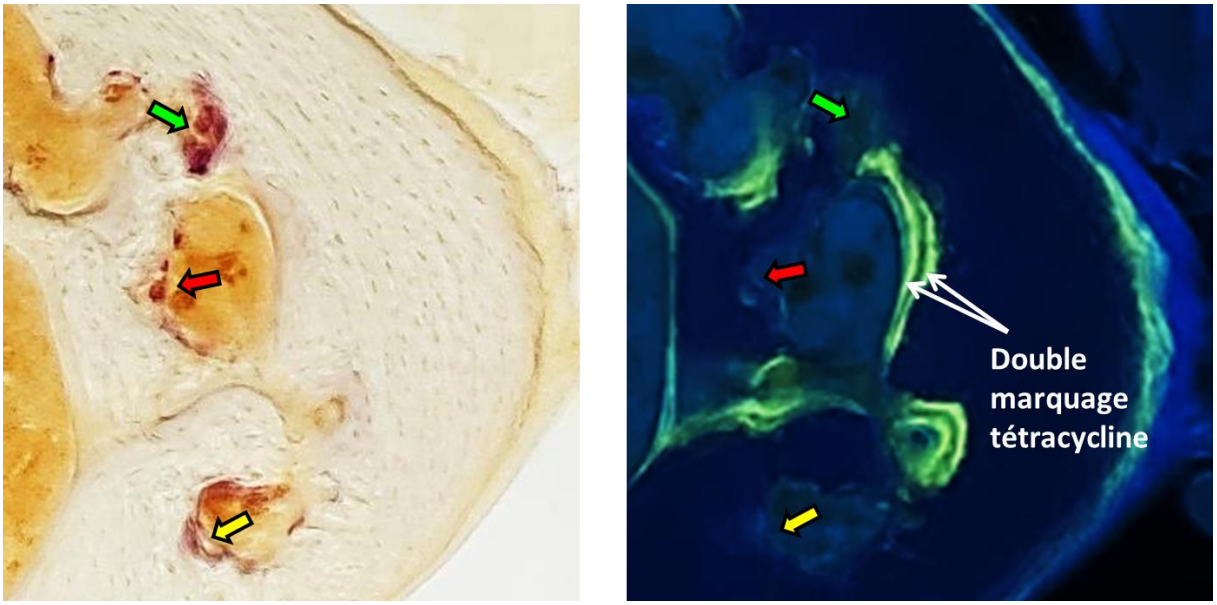


Figure S1 : Marquage TRAcP (image de gauche) et double marquage tétracycline (image de droite) sur une même zone d'une même tranche d'une coupe d'os cortical de souris DKO. Les petites flèches jaune, rouge et verte indiquent des foyers de résorption identifiés par le marquage TRAcP et ré-indiqués sur l'image de droite où les marquages tétracycline sont indiqués par des flèches blanches. Ces images proviennent des prises photographiques réalisées lors des analyses histomorphométriques de la première étude.

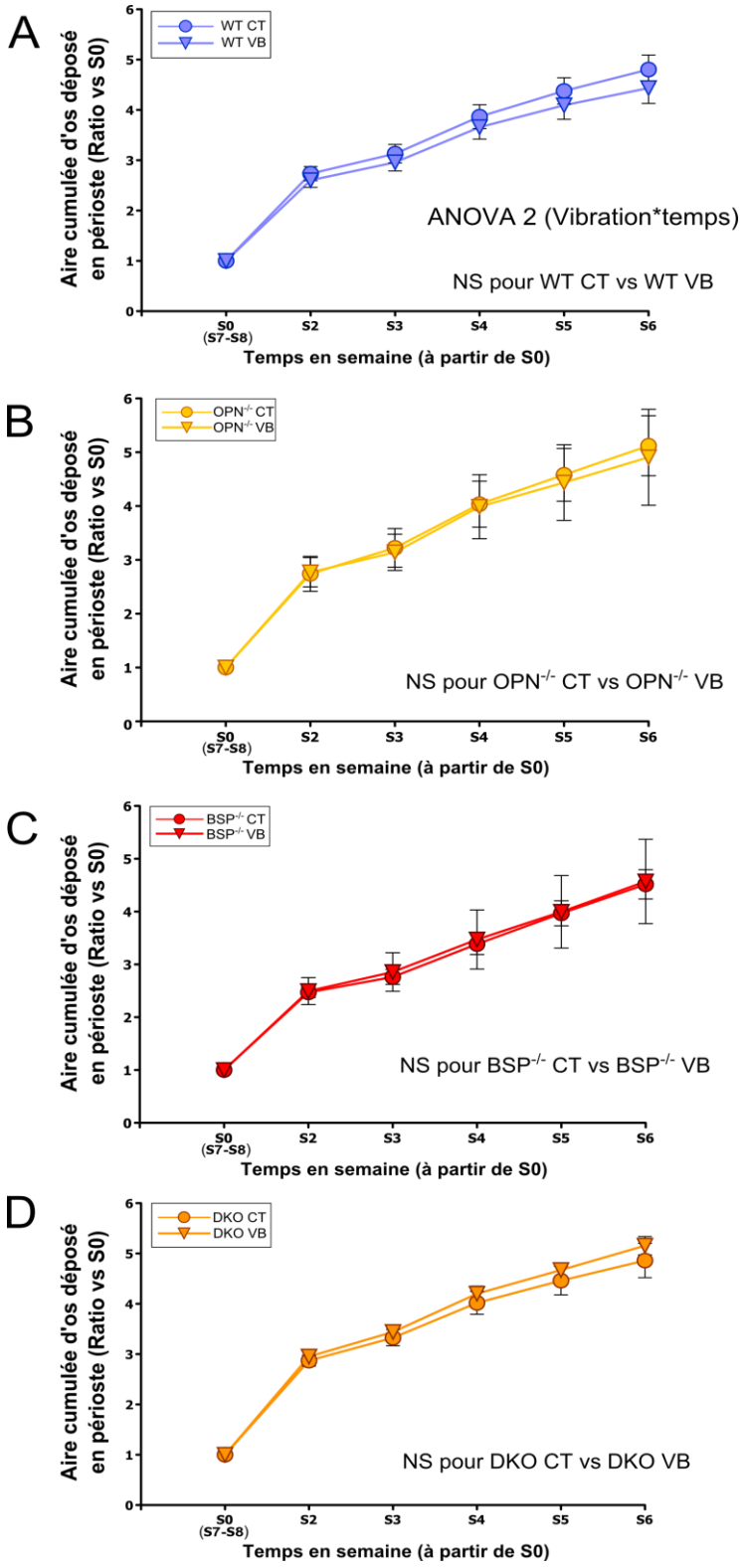


Figure S2: Formation périostée cumulée, normalisée par l'aire de la semaine S0 (dernière semaine avant vibration), pour les souris WT, OPN$^{-/-}$, BSP$^{-/-}$ et DKO des groupes contrôles (CT) et vibrés (VB). Sx : semaine de vibration. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Sur la droite, pour chaque graphique, les valeurs du test *F* de l'ANOVA 2 (en gras si p<0,05), n=6 souris / génotype.

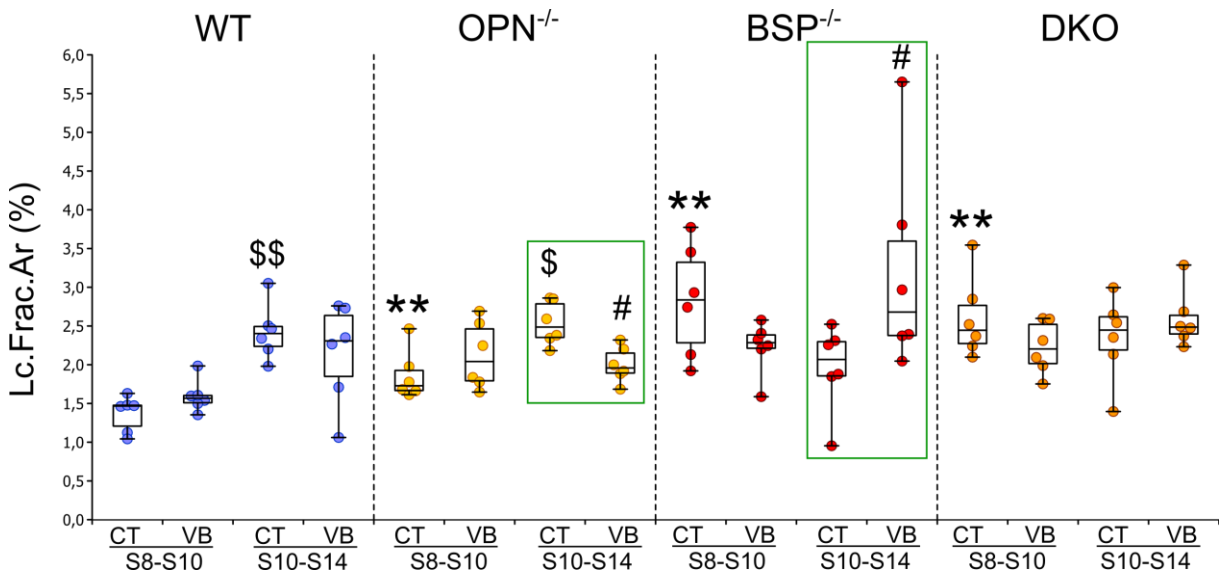


Figure S3 : Fraction d'aire lacunaire (Lc.Frac.Ar) dans le compartiment antérieur de souris WT, OPN$^{-/-}$, BSP$^{-/-}$ et DKO groupes contrôle (CT) et vibré (VB), mesurées dans l'os formé au cours des deux premières semaines (S8-S10) et des quatre dernières semaines (S10-S14) du protocole WBV. **p<0,01 entre mutants et WT de la même période, $^{\$}p$<0,05 ; $^{\$\$}p$<0,01 entre S8-S10 et S10-S14 pour les CT de chaque génotype, $^{\#}p$<0,05 entre CT et VB pour chaque génotype, test *U* de Mann-Whitney, n=6 souris/groupe. Les cadres vert soulignent les effets de la WBV.

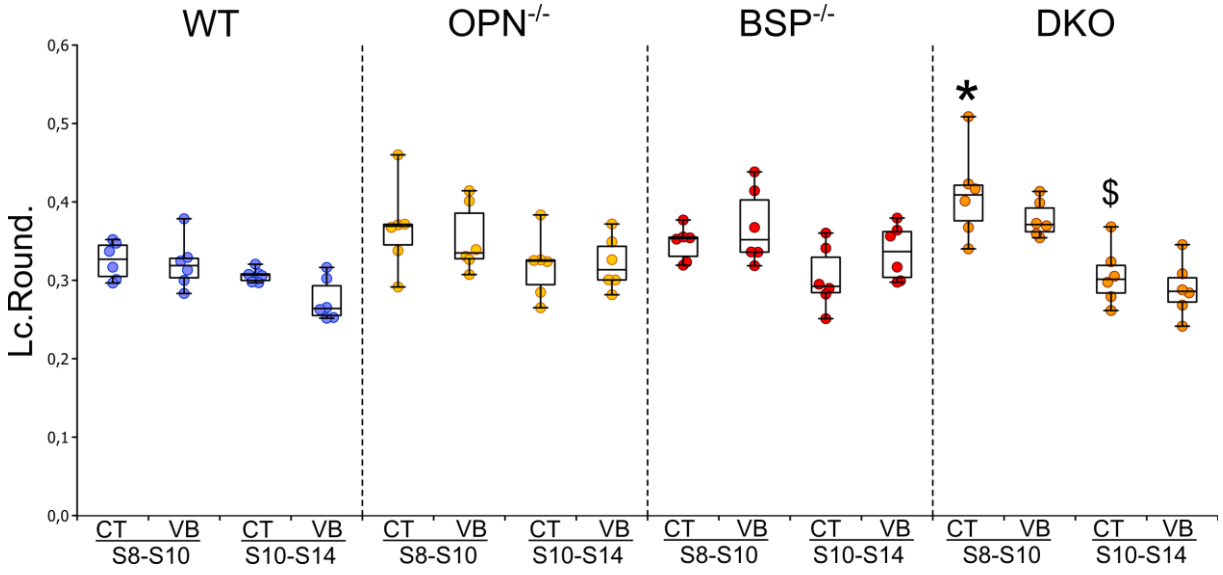


Figure S4 : Rondeur lacunaire (Lc.Round.) dans le compartiment antérieur de souris WT, OPN$^{-/-}$, BSP$^{-/-}$ et DKO groupes contrôle (CT) et vibré (VB), mesurées dans l'os formé au cours des deux premières semaines (S8-S10) et des quatre dernières semaines (S10-S14) du protocole WBV. *p<0,05 entre mutants et WT de la même période, $^{\$}p$<0,05 entre S8-S10 et S10-S14 pour les CT de chaque génotype, test *U* de Mann-Whitney, n=6 souris/groupe.

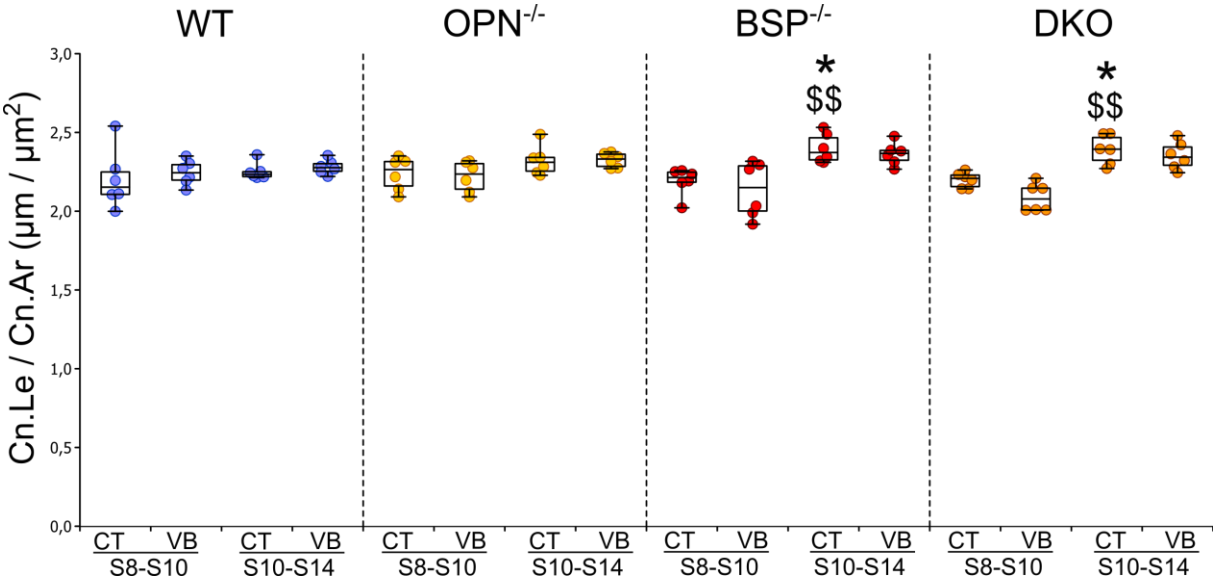


Figure S5 : Longueur canaliculaire par aire canaliculaire (Cn.Le / Cn.Ar) dans le compartiment antérieur de souris WT, OPN$^{-/-}$, BSP$^{-/-}$ et DKO groupes contrôle (CT) et vibré (VB), mesurées dans l'os formé au cours des deux premières semaines (S8-S10) et des quatre dernières semaines (S10-S14) du protocole WBV. *p<0,05 entre mutants et WT de la même période, $^{\$\$}p$<0,01 entre S8-S10 et S10-S14 pour les CT de chaque génotype, test *U* de Mann-Whitney, n=6 souris/groupe.

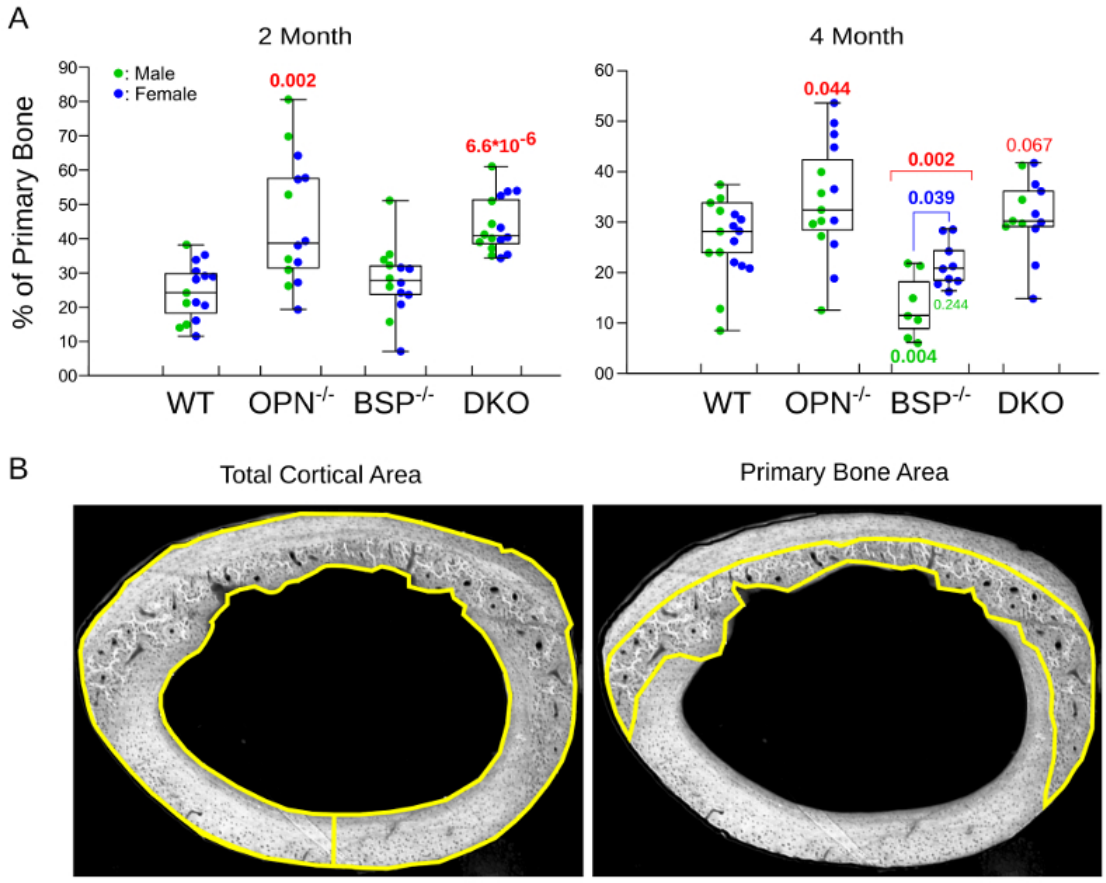


Figure S6 : A : Pourcentage d'os primaire dans les sections fémorales de 5 à 10 souris des deux âges et des deux sexes. Les valeurs individuelles des souris mâles (vert) et femelles (bleu) sont représentées par des points. Les valeurs de *p* vs WT des données appariées selon l'âge (pour les échantillons mixtes M+F) sont indiquées en rouge, les *p* entre les sexes ($BSP^{-/-}$, 4 mois) en bleu, les *p* vs WT des données appariés selon l'âge et le sexe ($BSP^{-/-}$, 4 mois) en vert ; les valeurs de *p* sont en gras si $p \leq 0{,}05$; test *U* de Mann-Whitney. B : Exemple de sélection de l'os total et de l'os primaire dans ImageJ (WT, mâle, 4 mois). (Malaval, Follet et al., article en préparation).

III) Discussion générale et perspectives

L'ensemble de nos travaux durant cette thèse a montré des résultats qui convergent dans le message biologique, à savoir que l'absence d'OPN induit une perte osseuse sous contrainte mécanique alors que l'absence de BSP induit ou potentialise un gain osseux, et qu'une relative insensibilité est observée quand ces deux protéines ne sont pas exprimées.

Il est important de discuter des limites mais aussi des avantages de l'ensemble de nos modèles. Tout d'abord nos souris sont issues d'un fond génique non consanguin, apportant donc une variabilité inter-individuelle non négligeable. Le choix initial de ce fond génique s'est basé sur le fait que les résultats obtenus peuvent être considérés comme robustes car les effets qui se verront malgré la variabilité auront davantage de chances d'être signifiants. Un deuxième élément est la différence à l'état basal dans la morphologie et la masse osseuse de nos souris, qui est un paramètre important à prendre en compte surtout lors de l'application de stimuli mécaniques. Il est de fait par exemple que les souris $OPN^{-/-}$ possèdent un os cortical plus épais que celui des $BSP^{-/-}$, dont les corticales sont plus fines que celles des souris WT, et on peut objecter que ceci peut affecter la réponse adaptative à la contrainte, indépendamment du génotype. Cependant, dans un modèle de contrainte appliquée au corps entier comme la vibration et l'hypergravité, l'adaptation du régime de contrainte aux propriétés mécaniques des différentes pièces osseuses est impossible, et donc les effets doivent être observés dans leur globalité. Une approche multi-sites a donc été mise en avant dans notre premier travail, notamment en étudiant les effets sur l'os trabéculaire vertébral, qui a montré la plupart du temps une réponse similaire à l'os trabéculaire fémoral, indépendamment de l'os concerné et donc de la géométrie des contraintes perçues. Il est important de noter que les deux régimes mécaniques (HG et WBV) ont convergé dans leur réponses, avec des effets toujours opposés entre les $OPN^{-/-}$ et les $BSP^{-/-}$, alors qu'ils n'affectaient pas les mêmes compartiments osseux.

L'hypergravité à 2G a augmenté le volume de l'os trabéculaire des souris WT comme cela avait été décrit par notre laboratoire sur le fond génique C57Bl/6 (Gnyubkin et al., 2015). Les souris $BSP^{-/-}$ ont montré globalement un effet ostéogénique plus élevé que les WT sous hypergravité, sachant que le réseau trabéculaire des $BSP^{-/-}$ est de base globalement plus dense que celui des WT. A l'inverse les souris $OPN^{-/-}$ ont réagi à l'HG par une perte osseuse dans leur réseau trabéculaire. Les DKO ont été insensible à ce régime. Un élément important concernant les souris $OPN^{-/-}$ est le fait qu'elles réagissent de manière opposée aux WT en termes de résorption. En effet, l'étude de Gnyubkin et al. avait déjà montré une chute de la résorption chez les WT sous hypergravité. L'augmentation de ce paramètre chez les $OPN^{-/-}$ est de ce fait assez intrigante. On peut mettre en parallèle ces éléments avec la résistance des souris $OPN^{-/-}$ à la décharge mécanique après suspension par la queue (Ishijima et al., 2002). Ceci a été mis en lien avec le fait que l'absence d'OPN dégrade le bon fonctionnement des ostéoclastes (Franzén et al., 2008; Rittling et al., 1998) ce qui serait aussi une cause de la résistance

des souris OPN$^{-/-}$ à la perte osseuse induite par ovariectomie (Yoshitake et al., 1999). Nos souris OPN$^{-/-}$ ont augmenté leur activité de résorption systématiquement dans toutes les situations expérimentales, amenant à une perte osseuse. L'ensemble de ces données suggère un rôle pivot de l'OPN, que ce soit direct ou indirect, dans l'orientation de la perception et/ou la réponse des ostéoclastes aux messages mécaniques. Il est à noter que les souris OPN$^{-/-}$ ont modifié leur activité de formation à la hausse ou à la baisse selon le régime de contrainte mécanique, soulignant un rôle de l'OPN vis-à-vis des activités de formation qui semble être plus complexe que celui concernant l'activité de résorption.

Sous vibration, nous n'avons pas observé le gain osseux dans l'os cortical des souris WT qui a été décrit précédemment (Gnyubkin et al., 2016). Il y a plusieurs éléments qui peuvent expliquer cette différence. Tout d'abord le temps de vibration qui a été utilisé n'est pas le même. Gnyubkin et. al. ont en effet testé 3 semaines et 9 semaines de WBV, en n'observant des effets ostéogéniques qu'à 3 semaines, suggérant une accélération de la croissance de l'os cortical plutôt qu'un accroissement absolu de son épaisseur finale. Notre protocole a duré 6 semaines et nos souris étaient légèrement plus âgées, et avaient donc probablement atteint en fin d'expérience une épaisseur corticale adulte, qui n'était pas susceptible d'accroissement. Les fortes réponses, diamétralement opposées, des souris BSP$^{-/-}$ et OPN$^{-/-}$ en termes d'épaisseur de l'os cortical et dynamiques cellulaires sont d'autant plus remarquables dans ce contexte d'insensibilité des WT, et suggèrent des effets d'accroissement absolu de l'épaisseur d'un os qui a terminé sa croissance. Il est aussi important de noter que les souris OPN$^{-/-}$ ont montré un effet structural sur l'os trabéculaire, non décrit par Gnyubkin et. al., avec en particulier une perte nette de BV/TV dans la vertèbre L2.

L'insensibilité des souris DKO à ces deux régimes est surprenante du fait de l'activité de remodelage accrue chez ces souris. En effet, les DKO sont en quelques sortes celles qui sont les plus dynamiques parmi les 4 génotypes ; elles possèdent une activité de formation absolue élevée dans le compartiment antérieur par rapport aux WT et l'activité de formation la plus élevée dans le compartiment postérieur parmi tous les génotypes. A côté de cela, le remodelage intra-cortical qu'elles subissent dans le compartiment postérieur rajoute un surplus de dynamique cellulaire. L'absence concomittante de la BSP et de l'OPN ne ramène donc pas le phénotype osseux à un état proche de celui des WT, mais génère un phénotype singulier. Par ailleurs, la dégradation du réseau canaliculaire observée chez les DKO dans les deux premières semaines de vibration suggère, comme discuté plus haut, un impact (négatif) spécifique sur ce type cellulaire en l'absence des deux protéines, qui est une une piste à explorer pour expliquer l'insensibilité de ces souris aux régimes de contrainte employés dans nos expériences.

Dans la première étude, nous avons pratiqué un double marquage par la tétracycline pour suivre la dynamique de formation osseuse. Les résultats de microtomographie ayant montré surtout des effets dans l'os cortical, nous avons procédé à l'évaluation de la dynamique corticale sur la base de ce marquage. Les résultats obtenus étaient significatifs et éclairants mais le protocole utilisé n'était pas absolument adéquat. En effet les deux injections étaient espacées de 4 jours pour être adapté à la

dynamique de formation de l'os trabéculaire murin, mais nous plaçaient à la limite de la sensibilité nécessaire à l'évaluation de la formation corticale, qui est plus lente. A la suite de ces résultats, nous avons décidé d'approfondir nos analyses dynamiques tout en rajoutant l'étude du réseau lacuno-canaliculaire pour évaluer s'il est différent entre les génotypes et s'il est affecté par la vibration. La technique de multi-marquage et l'étude du réseau lacuno-canaliculaire ont permis d'affiner les résultats observés avec un suivi précis de la cinétique. Cette approche nous a révélé que la survenue des effets de la vibration sur la dynamique est couplée avec une modification des paramètres de densité et d'aire lacunaire. Ces impacts se manifestent de manière opposées entre les souris $BSP^{-/-}$ et $OPN^{-/-}$ et sont observables au même moment, à savoir au-delà de deux semaines de contraintes. Cependant, les réseaux lacuno-canaliculaires à l'état de base ne sont pas très différents entre ces deux génotypes, à l'exception de l'aire lacunaire qui est plus élevée chez les $BSP^{-/-}$. Nos données suggèrent que l'explication des effets opposés de la WBV dans ces deux génotypes est donc plutôt à rechercher au niveau du comportement des ostéocytes individuels plutôt que dans l'architecture du réseau lacuno-canaliculaire, soulignant ainsi des effets de réponse cellulaire liés aux extinctions géniques.

Les moyens que nous possédions pour étudier le réseau lacuno-canaliculaire ont néanmoins limité notre analyse. La résolution de notre microscope confocal est de 100 nm. Sachant que le diamètre des canalicules varie généralement de 210 à 260 nm (Qin et al., 2020), il nous était impossible d'évaluer, par exemple, des changements de quelques dizaines de nanomètres du diamètre canaliculaire entre nos différents groupes. Ce paramètre est pourtant important car le remodelage lacuno-canaliculaire aurait pu être affecté par l'absence de BSP et/ou d'OPN, et par le régime vibratoire. L'étude aurait également gagné en efficacité par une analyse en 3D du réseau. Cependant la réalisation des images 3D comportant un volume du réseau lacuno-canaliculaire assez conséquent pour établir des comparaisons entre groupes nécessite des temps d'acquisitions très longs (plusieurs heures par souris). Ensuite, les analyses des images 3D nécessitent l'utilisation de codes en Python effectuant des calculs très lourds qui dépassent largement les capacités de nos ordinateurs. Le compromis a été donc d'effectuer les analyses en 2D en augmentant le plus possible les surfaces du réseau analysé pour avoir une représentativité fiable.

L'ensemble des résultats obtenus a néanmoins permis une description détaillée de plusieurs processus dont la dynamique corticale à l'état de base et sous vibration des 4 génotypes. En s'appuyant sur ces données, il serait intéressant de réitérer l'expérience de vibration en s'arrêtant après 2 semaines et d'analyser le réseau lacuno-canaliculaire formé pour voir si l'on observe des modifications qui n'étaient plus visibles au bout de 6 semaines de vibration. Une étude du profil d'expression génique semble aussi importante au bout de deux semaines de vibration étant donné que c'est à partir de ce moment que la dynamique osseuse semble être affectée. Cette étude devrait prendre la forme d'une analyse multi-génique, telle que celle que nous sommes en train de réaliser sur les ARN extraits en fin d'expérience des souris vibrées pendant 6 semaines (article, Figure 7, Tableau S5). La technique

utilisée sera le Nano-String qui diffère de la qRT-PCR par sa capacité à quantifier directement un grand nombre d'ARN messager (45 dans notre expérience), en très petite quantité et même à l'état partiellement dégradé. L'objectif sera de dégager des pistes en termes de voies de signalisations susceptibles d'être impliquées dans la réponse différentielle des génotypes WT et mutantes à la WBV.

Une autre approche permise par des temps d'expérimentation plus courts serait d'injecter, pendant la durée de l'expérimentation, les protéines OPN et BSP à des souris mutantes, ou à l'inverse des anticorps anti-OPN ou anti-BSP (ou les deux) chez les souris WT, (et anti-OPN chez les souris $BSP^{-/-}$), et d'observer le phénotype osseux qui en résulte, à l'état de base et sous contrainte mécanique. Ce type d'expérience permettra de confirmer ou d'infirmer l'implication directe ou pas de l'absence d'OPN ou de BSP dans les réponses du squelette que nous avons décrites. Cette approche a déjà été utilisée via l'injection de si-RNA ciblant l'ARNm de l'OPN lors de l'injection de PTH sur les calvaria de souris, et a mis en évidence que l'expression de la BSP ou de l'OPN était nécessaire à l'action anabolique de la PTH (Bouleftour et al., 2015).

Bien qu'il soit important d'adopter dans un premier temps une approche systémique pour avoir une idée globale des effets de l'absence d'une ou de plusieurs protéines afin de cibler par la suite un type cellulaire donné, les expériences réalisées sur des souris présentant une extinction génique globale peuvent présenter plusieurs paramètres confondant. Dans notre exemple l'OPN est une protéine ubiquitaire. Son extinction dans l'ensemble de l'organisme, ou sa surexpression dans le sérum des souris $BSP^{-/-}$ tout au long de leur vie (Granito et al., 2015) peuvent influencer par des voies systémiques le phénotype osseux. L'établissement et la caractérisation de souris avec un KO conditionnel de ces protéines aiderait à mieux comprendre les phénotypes osseux observés et leurs origines. Ces KO conditionnels peuvent être par exemple appliqués sur les ostéoclastes, les ostéoblastes ou les ostéocytes en observant si l'un des modèles peut reproduire le phénotype obtenu avec un KO total. Dans le cas des DKO, l'extinction génique de l'OPN et de la BSP de manière conditionnelle pourrait néanmoins s'avérer compliquée sur le plan technique, mais aussi économique.

Enfin dans une perspective méthodologique, le couplage de la transparisation, du multimarquage et de l'étude du réseau lacuno-canaliculaire s'avère un outil efficace pour évaluer la dynamique de l'os cortical. Cette combinaison de techniques existantes pourrait aussi être renforcée par l'utilisation des techniques de microscopie de fluorescence à feuille de lumière, qui donneraient une image en trois dimensions des multimarquages et, couplées à des analyses quantitatives, permettraient d'étudier la dynamique totale de l'os cortical (Greenbaum et al., 2017). Des ordinateurs puissants deviendraient alors indispensables pour automatiser et optimiser ce type de protocole.

IV) Bibliographie

Alauzet, C., Cunat, L., Wack, M., Lozniewski, A., Busby, H., Agrinier, N., Cailliez-Grimal, C., & Frippiat, J.-P. (2019). Hypergravity disrupts murine intestinal microbiota. *Scientific Reports*, *9*(1), 9410. https://doi.org/10.1038/s41598-019-45153-8

Amblard, D., Lafage-Proust, M.-H., Laib, A., Thomas, T., Rüegsegger, P., Alexandre, C., & Vico, L. (2003). Tail Suspension Induces Bone Loss in Skeletally Mature Mice in the C57BL/6J Strain but Not in the C3H/HeJ Strain. *Journal of Bone and Mineral Research*, *18*(3), 561–569. https://doi.org/10.1359/jbmr.2003.18.3.561

Ao, M., Chavez, M. B., Chu, E. Y., Hemstreet, K. C., Yin, Y., Yadav, M. C., Millán, J. L., Fisher, L. W., Goldberg, H. A., Somerman, M. J., & Foster, B. L. (2017). Overlapping functions of bone sialoprotein and pyrophosphate regulators in directing cementogenesis. *Bone*, *105*, 134–147. https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.08.027

Argyrou, C., & Lambrou, G. (2019). Hypergravity and its effects on bones and the musculoskeletal system: A narrative review. *Journal of Research and Practice on the Musculoskeletal System*, 1–4. https://doi.org/10.22540/JRPMS-03-001

Atkins, G. J., & Findlay, D. M. (2012). Osteocyte regulation of bone mineral: A little give and take. *Osteoporosis International*, *23*(8), 2067–2079. https://doi.org/10.1007/s00198-012-1915-z

Bacabac, R. G., Mizuno, D., Schmidt, C. F., MacKintosh, F. C., Van Loon, J. J. W. A., Klein-Nulend, J., & Smit, T. H. (2008). Round versus flat: Bone cell morphology, elasticity, and mechanosensing. *Journal of Biomechanics*, *41*(7), 1590–1598. https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2008.01.031

Baht, G. S., Hunter, G. K., & Goldberg, H. A. (2008). Bone sialoprotein–collagen interaction promotes hydroxyapatite nucleation. *Matrix Biology*, *27*(7), 600–608. https://doi.org/10.1016/j.matbio.2008.06.004

Barczyk, M., Carracedo, S., & Gullberg, D. (2009). Integrins. *Cell and Tissue Research*, *339*(1), 269. https://doi.org/10.1007/s00441-009-0834-6

Baron, R., & Kneissel, M. (2013). WNT signaling in bone homeostasis and disease: From human mutations to treatments. *Nature Medicine*, *19*(2), 179–192. https://doi.org/10.1038/nm.3074

Beninati, S., Senger, D. R., Cordella-Miele, E., Mukherjee, A. B., Chackalaparampil, I., Shanmugam, V., Singh, K., & Mukherjee, B. B. (1994). Osteopontin: Its Transglutaminase-Catalyzed Posttranslational Modifications and Cross-Linking to Fibronectin1. *The Journal of Biochemistry*, *115*(4), 675–682. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124395

Bergwitz, C., & Jüppner, H. (2010). Regulation of Phosphate Homeostasis by PTH, Vitamin D, and FGF23. *Annual Review of Medicine*, *61*(1), 91–104. https://doi.org/10.1146/annurev.med.051308.111339

Bernards, M. T., Qin, C., Ratner, B. D., & Jiang, S. (2008). Adhesion of MC3T3-E1 cells to bone sialoprotein and bone osteopontin specifically bound to collagen I. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *86A*(3), 779–787. https://doi.org/10.1002/jbm.a.31650

Bianco, P., Fisher, L. W., Young, M. F., Termine, J. D., & Robey, P. G. (1991). Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. *Calcified Tissue International*, *49*(6), 421–426. https://doi.org/10.1007/BF02555854

Bianco, P., & Robey, P. G. (2015). Skeletal stem cells. *Development*, *142*(6), 1023–1027. https://doi.org/10.1242/dev.102210

Blaber, E. A., Dvorochkin, N., Lee, C., Alwood, J. S., Yousuf, R., Pianetta, P., Globus, R. K., Burns, B. P., & Almeida, E. A. C. (2013). Microgravity Induces Pelvic Bone Loss through

Osteoclastic Activity, Osteocytic Osteolysis, and Osteoblastic Cell Cycle Inhibition by CDKN1a/p21. *PLOS ONE*, *8*(4), e61372. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061372

Bonewald, L. F. (2011). The amazing osteocyte. *Journal of Bone and Mineral Research*, *26*(2), 229–238. https://doi.org/10.1002/jbmr.320

Bonewald, L. F., & Johnson, M. L. (2008). Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone*, *42*(4), 606–615. https://doi.org/10.1016/j.bone.2007.12.224

Boskey, A. L., Spevak, L., Paschalis, E., Doty, S. B., & McKee, M. D. (2002). Osteopontin Deficiency Increases Mineral Content and Mineral Crystallinity in Mouse Bone. *Calcified Tissue International*, *71*(2), 145–154. https://doi.org/10.1007/s00223-001-1121-z

Bouleftour, W., Boudiffa, M., Wade-Gueye, N. M., Bouët, G., Cardelli, M., Laroche, N., Vanden-Bossche, A., Thomas, M., Bonnelye, E., Aubin, J. E., Vico, L., Lafage-Proust, M. H., & Malaval, L. (2014). Skeletal Development of Mice Lacking Bone Sialoprotein (BSP)—Impairment of Long Bone Growth and Progressive Establishment of High Trabecular Bone Mass. *PLoS ONE*, *9*(5), e95144. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095144

Bouleftour, W., Bouet, G., Granito, R. N., Thomas, M., Linossier, M.-T., Vanden-Bossche, A., Aubin, J. E., Lafage-Proust, M.-H., Vico, L., & Malaval, L. (2015). Blocking the Expression of Both Bone Sialoprotein (BSP) and Osteopontin (OPN) Impairs the Anabolic Action of PTH in Mouse Calvaria Bone: EITHER BSP OR OPN IS REQUIRED FOR PTH ACTION. *Journal of Cellular Physiology*, *230*(3), 568–577. https://doi.org/10.1002/jcp.24772

Bouleftour, W., Juignet, L., Bouet, G., Granito, R. N., Vanden-Bossche, A., Laroche, N., Aubin, J. E., Lafage-Proust, M.-H., Vico, L., & Malaval, L. (2016). The role of the SIBLING, Bone Sialoprotein in skeletal biology—Contribution of mouse experimental genetics. *Matrix Biology*, *52–54*, 60–77. https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.12.011

Bouleftour, W., Juignet, L., Verdière, L., Machuca-Gayet, I., Thomas, M., Laroche, N., Vanden-Bossche, A., Farlay, D., Thomas, C., Gineyts, E., Concordet, J. P., Renaud, J. B., Aubert, D., Teixeira, M., Peyruchaud, O., Vico, L., Lafage-Proust, M. H., Follet, H., & Malaval, L. (2019). Deletion of OPN in BSP knockout mice does not correct bone hypomineralization but results in high bone turnover. *Bone*, *120*, 411–422. https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.12.001

Britz, H. M., Carter, Y., Jokihaara, J., Leppänen, O. V., Järvinen, T. L. N., Belev, G., & Cooper, D. M. L. (2012). Prolonged unloading in growing rats reduces cortical osteocyte lacunar density and volume in the distal tibia. *Bone*, *51*(5), 913–919. https://doi.org/10.1016/j.bone.2012.08.112

Buenzli, P. R., & Sims, N. A. (2015). Quantifying the osteocyte network in the human skeleton. *Bone*, *75*, 144–150. https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.02.016

Buo, A. M., & Stains, J. P. (2014). Gap junctional regulation of signal transduction in bone cells. *FEBS Letters*, *588*(8), 1315–1321. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.01.025

Burra, S., Nicolella, D. P., & Jiang, J. X. (2011). Dark horse in osteocyte biology. *Communicative & Integrative Biology*, *4*(1), 48–50. https://doi.org/10.4161/cib.13646

Butezloff, M. M., Zamarioli, A., Leoni, G. B., Sousa-Neto, M. D., & Volpon, J. B. (2015). Whole-body vibration improves fracture healing and bone quality in rats with ovariectomy-induced osteoporosis1. *Acta Cirúrgica Brasileira*, *30*, 727–735. https://doi.org/10.1590/S0102-865020150110000002

Byrne, E. M., Farrell, E., McMahon, L. A., Haugh, M. G., O'Brien, F. J., Campbell, V. A., Prendergast, P. J., & O'Connell, B. C. (2008). Gene expression by marrow stromal cells in a porous collagen–glycosaminoglycan scaffold is affected by pore size and mechanical stimulation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *19*(11), 3455–3463. https://doi.org/10.1007/s10856-008-3506-2

Chellaiah, M. A., & Hruska, K. A. (2003). The Integrin {alpha} v {beta} 3 and CD44 Regulate the Actions of Osteopontin on Osteoclast Motility. *Calcified Tissue International*, *72*(3), 197–205. https://doi.org/10.1007/s00223-002-1025-6

Chellaiah, M. A., Kizer, N., Biswas, R., Alvarez, U., Strauss-Schoenberger, J., Rifas, L., Rittling, S. R., Denhardt, D. T., & Hruska, K. A. (2003). Osteopontin Deficiency Produces Osteoclast Dysfunction Due to Reduced CD44 Surface Expression. *Molecular Biology of the Cell*, *14*(1), 173–189. https://doi.org/10.1091/mbc.E02-06-0354

Chen, J., Shapiro, H. S., Wrana, J. L., Reimers, S., Heersche, J. N. M., & Sodek, J. (1991). Localization of bone sialoprotein (BSP) expression to sites of mineralized tissue formation in fetal rat tissues by In Situ hybridization. *Matrix*, *11*(2), 133–143. https://doi.org/10.1016/S0934-8832(11)80217-9

Chow, S. K. H., Leung, K. S., Qin, J., Guo, A., Sun, M., Qin, L., & Cheung, W. H. (2016). Mechanical stimulation enhanced estrogen receptor expression and callus formation in diaphyseal long bone fracture healing in ovariectomy-induced osteoporotic rats. *Osteoporosis International*, *27*(10), 2989–3000. https://doi.org/10.1007/s00198-016-3619-2

Christiansen, B. A., & Silva, M. J. (2006). The Effect of Varying Magnitudes of Whole-Body Vibration on Several Skeletal Sites in Mice. *Annals of Biomedical Engineering*, *34*(7), 1149–1156. https://doi.org/10.1007/s10439-006-9133-5

Ciani, C., Doty, S. B., & Fritton, S. P. (2009). An effective histological staining process to visualize bone interstitial fluid space using confocal microscopy. *Bone*, *44*(5), 1015–1017. https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.01.376

Cowin, S. C., Moss-Salentijn, L., & Moss, M. L. (1991). Candidates for the Mechanosensory System in Bone. *Journal of Biomechanical Engineering*, *113*(2), 191–197. https://doi.org/10.1115/1.2891234

Cresswell, E. N., Nguyen, T. M., Horsfield, M. W., Alepuz, A. J., Metzger, T. A., Niebur, G. L., & Hernandez, C. J. (2018). Mechanically induced bone formation is not sensitive to local osteocyte density in rat vertebral cancellous bone. *Journal of Orthopaedic Research*, *36*(2), 672–681. https://doi.org/10.1002/jor.23606

Dallas, S. L., & Moore, D. S. (2020). Using confocal imaging approaches to understand the structure and function of osteocytes and the lacunocanalicular network. *Bone*, *138*, 115463. https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115463

Dallas, S. L., Prideaux, M., & Bonewald, L. F. (2013). The Osteocyte: An Endocrine Cell … and More. *Endocrine Reviews*, *34*(5), 658–690. https://doi.org/10.1210/er.2012-1026

David, V., Martin, A., Hedge, A.-M., & Rowe, P. S. N. (2009). Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein (MEPE) Is a New Bone Renal Hormone and Vascularization Modulator. *Endocrinology*, *150*(9), 4012–4023. https://doi.org/10.1210/en.2009-0216

de La Dure-Molla, M., Philippe Fournier, B., & Berdal, A. (2015). Isolated dentinogenesis imperfecta and dentin dysplasia: Revision of the classification. *European Journal of Human Genetics*, *23*(4), 445–451. https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.159

Delaissé, J.-M., Andersen, T. L., Kristensen, H. B., Jensen, P. R., Andreasen, C. M., & Søe, K. (2020). Re-thinking the bone remodeling cycle mechanism and the origin of bone loss. *Bone*, *141*, 115628. https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115628

Denhardt, D. T., & Noda, M. (1998). Osteopontin expression and function: Role in bone remodeling. *Journal of Cellular Biochemistry*, *72*(S30-31), 92–102. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4644(1998)72:30/31+<92::AID-JCB13>3.0.CO;2-A

Dhayer, M. (2019). *Régulation transcriptionnelle du tissu osseux lors de vols spatiaux: Focus sur les cellules souches squelettiques et les ostéocytes* [These de doctorat, Lyon]. https://www.theses.fr/2019LYSES052

Dubayle, D., Vanden-Bossche, A., Beraneck, M., Vico, L., & Morel, J.-L. (2020). Effects of centrifugation and whole-body vibrations on blood–brain barrier permeability in mice. *Npj Microgravity*, *6*(1), 1–7. https://doi.org/10.1038/s41526-019-0094-z

Duong, L. T. (1998). Integrin-mediated signaling in the regulation of osteoclast adhesion and activation. *Frontiers in Bioscience*, *3*(4), d849-864. https://doi.org/10.2741/A319

Duong, L. T., Lakkakorpi, P., Nakamura, I., & Rodan, G. A. (2000). Integrins and signaling in osteoclast function. *Matrix Biology*, *19*(2), 97–105. https://doi.org/10.1016/S0945-053X(00)00051-2

Feng, J. Q., Zhang, J., Dallas, S. L., Lu, Y., Chen, S., Tan, X., Owen, M., Harris, S. E., & Macdougall, M. (2002). Dentin Matrix Protein 1, a Target Molecule for Cbfa1 in Bone, Is a Unique Bone Marker Gene. *Journal of Bone and Mineral Research*, *17*(10), 1822–1831. https://doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.10.1822

Fisher, L. W., & Fedarko, N. S. (2003). Six Genes Expressed in Bones and Teeth Encode the Current Members of the SIBLING Family of Proteins. *Connective Tissue Research*, *44*(1), 33–40. https://doi.org/10.1080/03008200390152061

Fisher, L. W., Whitson, S. W., Avioli, L. V., & Termine, J. D. (1983). Matrix sialoprotein of developing bone. *Journal of Biological Chemistry*, *258*(20), 12723–12727. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)44236-0

Fonseca, H., Moreira-Gonçalves, D., Coriolano, H.-J. A., & Duarte, J. A. (2014). Bone Quality: The Determinants of Bone Strength and Fragility. *Sports Medicine*, *44*(1), 37–53. https://doi.org/10.1007/s40279-013-0100-7

Forsprecher, J., Wang, Z., Goldberg, H. A., & Kaartinen, M. T. (2011). Transglutaminase-mediated oligomerization promotes osteoblast adhesive properties of osteopontin and bone sialoprotein. *Cell Adhesion & Migration*, *5*(1), 65–72. https://doi.org/10.4161/cam.5.1.13369

Franzén, A., Hultenby, K., Reinholt, F. P., Önnerfjord, P., & Heinegård, D. (2008). Altered osteoclast development and function in osteopontin deficient mice. *Journal of Orthopaedic Research*, *26*(5), 721–728. https://doi.org/10.1002/jor.20544

Frost, H. M. (1987). Bone "mass" and the "mechanostat": A proposal. *The Anatomical Record*, *219*(1), 1–9. https://doi.org/10.1002/ar.1092190104

Ganss, B., Kim, R. H., & Sodek, J. (1999). Bone Sialoprotein. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, *10*(1), 79–98. https://doi.org/10.1177/10454411990100010401

Gao, J., Gong, H., Huang, X., Zhang, R., Ma, R., & Zhu, D. (2016). Multi-Level Assessment of Fracture Calluses in Rats Subjected to Low-Magnitude High-Frequency Vibration with Different Rest Periods. *Annals of Biomedical Engineering*, *44*(8), 2489–2504. https://doi.org/10.1007/s10439-015-1532-z

Gardinier, J. D., Al-Omaishi, S., Morris, M. D., & Kohn, D. H. (2016). PTH signaling mediates perilacunar remodeling during exercise. *Matrix Biology*, *52–54*, 162–175. https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.02.010

Gardinier, J. D., Rostami, N., Juliano, L., & Zhang, C. (2018). Bone adaptation in response to treadmill exercise in young and adult mice. *Bone Reports*, *8*, 29–37. https://doi.org/10.1016/j.bonr.2018.01.003

Gatti, V., Azoulay, E. M., & Fritton, S. P. (2018). Microstructural changes associated with osteoporosis negatively affect loading-induced fluid flow around osteocytes in cortical bone. *Journal of Biomechanics*, *66*, 127–136. https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2017.11.011

Genetos, D. C., Yellowley, C. E., & Loots, G. G. (2011). Prostaglandin E2 Signals Through PTGER2 to Regulate Sclerostin Expression. *PLOS ONE*, *6*(3), e17772. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017772

Gerbaix, M., Gnyubkin, V., Farlay, D., Olivier, C., Ammann, P., Courbon, G., Laroche, N., Gential, R., Follet, H., PEYRIN, F., Shenkman, B., Gauquelin-Koch, G., & Vico, L. (2017). One-month spaceflight compromises the bone microstructure, tissue-level mechanical properties, osteocyte survival and lacunae volume in mature mice skeletons. *Scientific Reports*, *7*(1), 2659. https://doi.org/10.1038/s41598-017-03014-2

Gericke, A., Qin, C., Sun, Y., Redfern, R., Redfern, D., Fujimoto, Y., Taleb, H., Butler, W. T., & Boskey, A. L. (2010). Different Forms of DMP1 Play Distinct Roles in Mineralization. *Journal of Dental Research*, *89*(4), 355–359. https://doi.org/10.1177/0022034510363250

Gnyubkin, V., Guignandon, A., Laroche, N., Vanden-Bossche, A., Malaval, L., & Vico, L. (2016). High-acceleration whole body vibration stimulates cortical bone accrual and increases bone mineral content in growing mice. *Journal of Biomechanics*, *49*(9), 1899–1908. https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2016.04.031

Gnyubkin, V., Guignandon, A., Laroche, N., Vanden-Bossche, A., Normand, M., Lafage-Proust, M.-H., & Vico, L. (2015). Effects of chronic hypergravity: From adaptive to deleterious responses in growing mouse skeleton. *Journal of Applied Physiology*, *119*(8), 908–917. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00364.2015

Goldberg, H. A., Warner, K. J., Li, M. C., & Hunter, G. K. (2001). Binding of Bone Sialoprotein, Osteopontin and Synthetic Polypeptides to Hydroxyapatite. *Connective Tissue Research*, *42*(1), 25–37. https://doi.org/10.3109/03008200109014246

Gordon, J. A. R., Tye, C. E., Sampaio, A. V., Underhill, T. M., Hunter, G. K., & Goldberg, H. A. (2007). Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *Bone*, *41*(3), 462–473. https://doi.org/10.1016/j.bone.2007.04.191

Gowen, L. C., Petersen, D. N., Mansolf, A. L., Qi, H., Stock, J. L., Tkalcevic, G. T., Simmons, H. A., Crawford, D. T., Chidsey-Frink, K. L., Ke, H. Z., McNeish, J. D., & Brown, T. A. (2003). Targeted Disruption of the Osteoblast/Osteocyte Factor 45 Gene (*OF45*) Results in Increased Bone Formation and Bone Mass. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(3), 1998–2007. https://doi.org/10.1074/jbc.M203250200

Granito, R. neves, Bouleftour, W., Sabido, O., Lescale, C., Thomas, M., Aubin, J. E., Goodhardt, M., Vico, L., & Malaval, L. (2015). Absence of Bone Sialoprotein (BSP) Alters Profoundly Hematopoiesis and Upregulates Osteopontin: LACK OF BSP ALTERS BONE MARROW COMPOSITION. *Journal of Cellular Physiology*, *230*(6), 1342–1351. https://doi.org/10.1002/jcp.24877

Greenbaum, A., Chan, K. Y., Dobreva, T., Brown, D., Balani, D. H., Boyce, R., Kronenberg, H. M., McBride, H. J., & Gradinaru, V. (2017). Bone CLARITY: Clearing, imaging, and computational analysis of osteoprogenitors within intact bone marrow. *Science Translational Medicine*, *9*(387), eaah6518. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aah6518

Grimston, S. K., Brodt, M. D., Silva, M. J., & Civitelli, R. (2008). Attenuated Response to In Vivo Mechanical Loading in Mice With Conditional Osteoblast Ablation of the Connexin43 Gene (Gja1). *Journal of Bone and Mineral Research*, *23*(6), 879–886. https://doi.org/10.1359/jbmr.080222

Gross, T. S., King, K. A., Rabaia, N. A., Pathare, P., & Srinivasan, S. (2005). Upregulation of Osteopontin by Osteocytes Deprived of Mechanical Loading or Oxygen. *Journal of Bone and Mineral Research*, *20*(2), 250–256. https://doi.org/10.1359/JBMR.041004

Guo, R., Rowe, P. S. N., Liu, S., Simpson, L. G., Xiao, Z.-S., & Darryl Quarles, L. (2002). Inhibition of MEPE cleavage by Phex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *297*(1), 38–45. https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02125-3

Hart, N. H., Nimphius, S., Rantalainen, T., Ireland, A., Siafarikas, A., & Newton, R. U. (2017). Mechanical basis of bone strength: Influence of bone material, bone structure and muscle action. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, *17*(3), 114–139.

He, G., Dahl, T., Veis, A., & George, A. (2003). Dentin Matrix Protein 1 Initiates Hydroxyapatite Formation In Vitro. *Connective Tissue Research*, *44*(1), 240–245. https://doi.org/10.1080/03008200390181726

Hemmatian, H., Jalali, R., Semeins, C. M., Hogervorst, J. M. A., van Lenthe, G. H., Klein-Nulend, J., & Bakker, A. D. (2018). Mechanical Loading Differentially Affects Osteocytes in Fibulae from Lactating Mice Compared to Osteocytes in Virgin Mice: Possible Role for Lacuna Size. *Calcified Tissue International*, *103*(6), 675–685. https://doi.org/10.1007/s00223-018-0463-8

Hemmatian, H., Laurent, M. R., Bakker, A. D., Vanderschueren, D., Klein-Nulend, J., & van Lenthe, G. H. (2018). Age-related changes in female mouse cortical bone microporosity. *Bone*, *113*, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.05.003

Henriksen, K., Neutzsky-Wulff, A. V., Bonewald, L. F., & Karsdal, M. A. (2009). Local communication on and within bone controls bone remodeling. *Bone*, *44*(6), 1026–1033. https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.03.671

Heveran, C. M., Rauff, A., King, K. B., Carpenter, R. D., & Ferguson, V. L. (2018). A new open-source tool for measuring 3D osteocyte lacunar geometries from confocal laser scanning microscopy reveals age-related changes to lacunar size and shape in cortical mouse bone. *Bone*, *110*, 115–127. https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.01.018

Heveran, C. M., Schurman, C. A., Acevedo, C., Livingston, E. W., Howe, D., Schaible, E. G., Hunt, H. B., Rauff, A., Donnelly, E., Carpenter, R. D., Levi, M., Lau, A. G., Bateman, T. A., Alliston, T., King, K. B., & Ferguson, V. L. (2019). Chronic kidney disease and aging differentially diminish bone material and microarchitecture in C57Bl/6 mice. *Bone*, *127*, 91–103. https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.04.019

Hoac, B., Østergaard, M., Wittig, N. K., Boukpessi, T., Buss, D. J., Chaussain, C., Birkedal, H., Murshed, M., & McKee, M. D. (2020). Genetic ablation of osteopontin in osteomalacic *Hyp* mice partially rescues the deficient mineralization without correcting hypophosphatemia. *Journal of Bone and Mineral Research*, jbmr.4101. https://doi.org/10.1002/jbmr.4101

Hong, S.-Y., Jeon, Y.-M., Lee, H.-J., Kim, J.-G., Baek, J.-A., & Lee, J.-C. (2010). Activation of RhoA and FAK induces ERK-mediated osteopontin expression in mechanical force-subjected periodontal ligament fibroblasts. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *335*(1), 263–272. https://doi.org/10.1007/s11010-009-0276-1

Huang, W., Carlsen, B., Rudkin, G., Berry, M., Ishida, K., Yamaguchi, D. T., & Miller, T. A. (2004). Osteopontin is a negative regulator of proliferation and differentiation in MC3T3-E1 pre-osteoblastic cells. *Bone*, *34*(5), 799–808. https://doi.org/10.1016/j.bone.2003.11.027

Hunter, G. K., & Goldberg, H. A. (1994). Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: Role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Biochemical Journal*, *302*(1), 175–179. https://doi.org/10.1042/bj3020175

Ikawa, T., Kawaguchi, A., Okabe, T., Ninomiya, T., Nakamichi, Y., Nakamura, M., Uehara, S., Nakamura, H., Udagawa, N., Takahashi, N., Nakamura, H., & Wakitani, S. (2011). Hypergravity suppresses bone resorption in ovariectomized rats. *Advances in Space Research*, *47*(7), 1214–1224. https://doi.org/10.1016/j.asr.2010.12.004

Ikeda, K., & Takeshita, S. (2016). The role of osteoclast differentiation and function in skeletal homeostasis. *The Journal of Biochemistry*, *159*(1), 1–8. https://doi.org/10.1093/jb/mvv112

Ishijima, M., Tsuji, K., Rittling, S. R., Yamashita, T., Kurosawa, H., Denhardt, D. T., Nifuji, A., & Noda, M. (2002). Resistance to Unloading-Induced Three-Dimensional Bone Loss in

Osteopontin-Deficient Mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, *17*(4), 661–667. https://doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.4.661

Iwaniec, U. T., & Turner, R. T. (2016). Influence of body weight on bone mass, architecture and turnover. *Journal of Endocrinology*, *230*(3), R115–R130. https://doi.org/10.1530/JOE-16-0089

Jacobs, C. R., Temiyasathit, S., & Castillo, A. B. (2010). Osteocyte Mechanobiology and Pericellular Mechanics. *Annual Review of Biomedical Engineering*, *12*(1), 369–400. https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-070909-105302

Jain, A., Fisher, L. W., & Fedarko, N. S. (2008). Bone Sialoprotein Binding to Matrix Metalloproteinase-2 Alters Enzyme Inhibition Kinetics. *Biochemistry*, *47*(22), 5986–5995. https://doi.org/10.1021/bi800133n

Jani, P. H., Gibson, M. P., Liu, C., Zhang, H., Wang, X., Lu, Y., & Qin, C. (2016). Transgenic expression of Dspp partially rescued the long bone defects of Dmp1-null mice. *Matrix Biology*, *52–54*, 95–112. https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.12.001

Jiang, L., & Tang, Z. (2018). Expression and regulation of the ERK1/2 and p38 MAPK signaling pathways in periodontal tissue remodeling of orthodontic tooth movement. *Molecular Medicine Reports*, *17*(1), 1499–1506. https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8021

Jing, Baik, A. D., Lu, X. L., Zhou, B., Lai, X., Wang, L., Luo, E., & Guo, X. E. (2014). In situ intracellular calcium oscillations in osteocytes in intact mouse long bones under dynamic mechanical loading. *The FASEB Journal*, *28*(4), 1582–1592. https://doi.org/10.1096/fj.13-237578

Jing, Yi, Y., Luo, W., Zhang, S., Yuan, Q., Wang, J., Lachika, E., Zhao, Z., & Zhao, H. (2019). Tissue Clearing and Its Application to Bone and Dental Tissues. *Journal of Dental Research*, *98*(6), 621–631. https://doi.org/10.1177/0022034519844510

Jing, Zhang, C., Liu, X., Zhou, L., Liu, J., Yao, Y., Yu, J., Weng, Y., Pan, M., Liu, J., Wang, Z., Sun, Y., & Sun, Y. E. (2018). Glycosylation of dentin matrix protein 1 is a novel key element for astrocyte maturation and BBB integrity. *Protein & Cell*, *9*(3), 298–309. https://doi.org/10.1007/s13238-017-0449-8

Kaartinen, M. T., Pirhonen, A., Linnala-Kankkunen, A., & Mäenpää, P. H. (1999). Cross-linking of Osteopontin by Tissue Transglutaminase Increases Its Collagen Binding Properties *. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(3), 1729–1735. https://doi.org/10.1074/jbc.274.3.1729

Kaneko, K., Ito, M., Naoe, Y., Lacy-Hulbert, A., & Ikeda, K. (2014). Integrin αv in the mechanical response of osteoblast lineage cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *447*(2), 352–357. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.04.006

Kang, M.-N., Yoon, H.-H., Seo, Y.-K., & Park, J.-K. (2012). Effect of Mechanical Stimulation on the Differentiation of Cord Stem Cells. *Connective Tissue Research*, *53*(2), 149–159. https://doi.org/10.3109/03008207.2011.619284

Kawao, N., Koji, Kohei, & Kaji, H. (2018). Effects of hypergravity on gene levels in anti-gravity muscle and bone through the vestibular system in mice. *The Journal of Physiological Sciences*, *68*(5), 609–616. https://doi.org/10.1007/s12576-017-0566-4

Kawao, N., Morita, H., Obata, K., Tamura, Y., Okumoto, K., & Kaji, H. (2016). The vestibular system is critical for the changes in muscle and bone induced by hypergravity in mice. *Physiological Reports*, *4*(19), e12979. https://doi.org/10.14814/phy2.12979

Kawasaki, K. (2011). The SCPP Gene Family and the Complexity of Hard Tissues in Vertebrates. *Cells Tissues Organs*, *194*(2–4), 108–112. https://doi.org/10.1159/000324225

Kawasaki, K., Buchanan, A. V., & Weiss, K. M. (2007). Gene Duplication and the Evolution of Vertebrate Skeletal Mineralization. *Cells Tissues Organs*, *186*(1), 7–24. https://doi.org/10.1159/000102678

Kawasaki, K., & Weiss, K. M. (2006). Evolutionary genetics of vertebrate tissue mineralization: The origin and evolution of the secretory calcium-binding phosphoprotein family. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, *306B*(3), 295–316. https://doi.org/10.1002/jez.b.21088

Kaya, S., Basta-Pljakic, J., Seref-Ferlengez, Z., Majeska, R. J., Cardoso, L., Bromage, T. G., Zhang, Q., Flach, C. R., Mendelsohn, R., Yakar, S., Fritton, S. P., & Schaffler, M. B. (2017). Lactation-Induced Changes in the Volume of Osteocyte Lacunar-Canalicular Space Alter Mechanical Properties in Cortical Bone Tissue. *Journal of Bone and Mineral Research*, *32*(4), 688–697. https://doi.org/10.1002/jbmr.3044

Kim, J.-M., Kim, M. Y., Lee, K., & Jeong, D. (2016). Distinctive and selective route of PI3K/PKCα-PKCδ/RhoA-Rac1 signaling in osteoclastic cell migration. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *437*, 261–267. https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.08.042

King, K. B., Opel, C. F., & Rempel, D. M. (2005). Cyclical articular joint loading leads to cartilage thinning and osteopontin production in a novel in vivo rabbit model of repetitive finger flexion. *Osteoarthritis and Cartilage*, *13*(11), 971–978. https://doi.org/10.1016/j.joca.2005.06.015

Klein-Nulend, J., Roelofsen, J., Semeins, C. M., Bronckers, A. L. J. J., & Burger, E. H. (1997). Mechanical stimulation of osteopontin mRNA expression and synthesis in bone cell cultures. *Journal of Cellular Physiology*, *170*(2), 174–181. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199702)170:2<174::AID-JCP9>3.0.CO;2-L

Knothe Tate, M. L., Niederer, P., & Knothe, U. (1998). In Vivo Tracer Transport Through the Lacunocanalicular System of Rat Bone in an Environment Devoid of Mechanical Loading. *Bone*, *22*(2), 107–117. https://doi.org/10.1016/S8756-3282(97)00234-2

Kreke, M. R., Huckle, W. R., & Goldstein, A. S. (2005). Fluid flow stimulates expression of osteopontin and bone sialoprotein by bone marrow stromal cells in a temporally dependent manner. *Bone*, *36*(6), 1047–1055. https://doi.org/10.1016/j.bone.2005.03.008

Kubota, T., Yamauchi, M., Onozaki, J., Sato, S., Suzuki, Y., & Sodek, J. (1993). Influence of an intermittent compressive force on matrix protein expression by ROS 172.8 cells, with selective stimulation of osteopontin. *Archives of Oral Biology*, *38*(1), 23–30. https://doi.org/10.1016/0003-9969(93)90150-K

Kusuyama, J., Bandow, K., Ohnishi, T., Hisadome, M., Shima, K., Semba, I., & Matsuguchi, T. (2017). Osteopontin inhibits osteoblast responsiveness through the down-regulation of focal adhesion kinase mediated by the induction of low–molecular weight protein tyrosine phosphatase. *Molecular Biology of the Cell*, *28*(10), 1326–1336. https://doi.org/10.1091/mbc.e16-10-0716

Lane, N. E., Yao, W., Balooch, M., Nalla, R. K., Balooch, G., Habelitz, S., Kinney, J. H., & Bonewald, L. F. (2006). Glucocorticoid-Treated Mice Have Localized Changes in Trabecular Bone Material Properties and Osteocyte Lacunar Size That Are Not Observed in Placebo-Treated or Estrogen-Deficient Mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, *21*(3), 466–476. https://doi.org/10.1359/JBMR.051103

Latza, J., Otte, M., Lindner, T., Fischer, D.-C., Bruhn, S., Hollinski, R., Warkentin, M., Mittlmeier, T., & Müller-Hilke, B. (2020). Interval Training Is Not Superior to Endurance Training With Respect to Bone Accrual of Ovariectomized Mice. *Frontiers in Physiology*, *0*. https://doi.org/10.3389/fphys.2020.01096

Lee, K. L., Hoey, D. A., Spasic, M., Tang, T., Hammond, H. K., & Jacobs, C. R. (2014). Adenylyl cyclase 6 mediates loading-induced bone adaptation in vivo. *The FASEB Journal*, *28*(3), 1157–1165. https://doi.org/10.1096/fj.13-240432

Li, X., Han, L., Nookaew, I., Mannen, E., Silva, M. J., Almeida, M., & Xiong, J. (2019). Stimulation of Piezo1 by mechanical signals promotes bone anabolism. *ELife*, *8*. https://doi.org/10.7554/eLife.49631

Liang, T., Zhang, H., Xu, Q., Wang, S., Qin, C., & Lu, Y. (2019). Mutant Dentin Sialophosphoprotein Causes Dentinogenesis Imperfecta. *Journal of Dental Research*, *98*(8), 912–919. https://doi.org/10.1177/0022034519854029

Licini, C., Vitale-Brovarone, C., & Mattioli-Belmonte, M. (2019). Collagen and non-collagenous proteins molecular crosstalk in the pathophysiology of osteoporosis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *49*, 59–69. https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.09.001

Ling, Y., Rios, H. F., Myers, E. R., Lu, Y., Feng, J. Q., & Boskey, A. L. (2005). DMP1 Depletion Decreases Bone Mineralization In Vivo: An FTIR Imaging Analysis. *Journal of Bone and Mineral Research*, *20*(12), 2169–2177. https://doi.org/10.1359/JBMR.050815

Litzenberger, J. B., Tang, W. J., Castillo, A. B., & Jacobs, C. R. (2009). Deletion of β1 Integrins from Cortical Osteocytes Reduces Load-Induced Bone Formation. *Cellular and Molecular Bioengineering*, *2*(3), 416–424. https://doi.org/10.1007/s12195-009-0068-4

Lloyd, S. A., Lewis, G. S., Zhang, Y., Paul, E. M., & Donahue, H. J. (2012). Connexin 43 deficiency attenuates loss of trabecular bone and prevents suppression of cortical bone formation during unloading. *Journal of Bone and Mineral Research*, *27*(11), 2359–2372. https://doi.org/10.1002/jbmr.1687

Long, F. (2012). Building strong bones: Molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *13*(1), 27–38. https://doi.org/10.1038/nrm3254

Loots, G. G., Keller, H., Leupin, O., Murugesh, D., Collette, N. M., & Genetos, D. C. (2012). TGF-β regulates sclerostin expression via the ECR5 enhancer. *Bone*, *50*(3), 663–669. https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.11.016

Luukkonen, J., Hilli, M., Nakamura, M., Ritamo, I., Valmu, L., Kauppinen, K., Tuukkanen, J., & Lehenkari, P. (2019). Osteoclasts secrete osteopontin into resorption lacunae during bone resorption. *Histochemistry and Cell Biology*, *151*(6), 475–487. https://doi.org/10.1007/s00418-019-01770-y

Lyons, J. S., Joca, H. C., Law, R. A., Williams, K. M., Kerr, J. P., Shi, G., Khairallah, R. J., Martin, S. S., Konstantopoulos, K., Ward, C. W., & Stains, J. P. (2017). Microtubules tune mechanotransduction through NOX2 and TRPV4 to decrease sclerostin abundance in osteocytes. *Science Signaling*, *10*(506). https://doi.org/10.1126/scisignal.aan5748

Main, R. P., Shefelbine, S. J., Meakin, L. B., Silva, M. J., Meulen, M. C. H. van der, & Willie, B. M. (2020). Murine Axial Compression Tibial Loading Model to Study Bone Mechanobiology: Implementing the Model and Reporting Results. *Journal of Orthopaedic Research*, *38*(2), 233–252. https://doi.org/10.1002/jor.24466

Majerczak, J., Filipowska, J., Tylko, G., Guzik, M., Karasinski, J., Piechowicz, E., Pyza, E., Chlopicki, S., & Zoladz, J. A. (2020). Impact of long-lasting spontaneous physical activity on bone morphogenetic protein 4 in the heart and tibia in murine model of heart failure. *Physiological Reports*, *8*(8), e14412. https://doi.org/10.14814/phy2.14412

Malaval, L., Wade-Guéye, N. M., Boudiffa, M., Fei, J., Zirngibl, R., Chen, F., Laroche, N., Roux, J.-P., Burt-Pichat, B., Duboeuf, F., Boivin, G., Jurdic, P., Lafage-Proust, M.-H., Amédée, J., Vico, L., Rossant, J., & Aubin, J. E. (2008). Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis. *Journal of Experimental Medicine*, *205*(5), 1145–1153. https://doi.org/10.1084/jem.20071294

Malone, A. M. D., Anderson, C. T., Tummala, P., Kwon, R. Y., Johnston, T. R., Stearns, T., & Jacobs, C. R. (2007). Primary cilia mediate mechanosensing in bone cells by a calcium-independent

mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(33), 13325–13330. https://doi.org/10.1073/pnas.0700636104

Manolagas, S. C. (2000). Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis*. *Endocrine Reviews*, *21*(2), 115–137. https://doi.org/10.1210/edrv.21.2.0395

Martin, A., David, V., Laurence, J. S., Schwarz, P. M., Lafer, E. M., Hedge, A.-M., & Rowe, P. S. N. (2008). Degradation of MEPE, DMP1, and Release of SIBLING ASARM-Peptides (Minhibins): ASARM-Peptide(s) Are Directly Responsible for Defective Mineralization in HYP. *Endocrinology*, *149*(4), 1757–1772. https://doi.org/10.1210/en.2007-1205

McKEE, M. D., & Nanci, A. (1995). Osteopontin and the Bone Remodeling Sequence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *760*(1), 177–189. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1995.tb44629.x

McNamara, L. M., Majeska, R. J., Weinbaum, S., Friedrich, V., & Schaffler, M. B. (2009). Attachment of Osteocyte Cell Processes to the Bone Matrix. *The Anatomical Record*, *292*(3), 355–363. https://doi.org/10.1002/ar.20869

Melville, K. M., Robling, A. G., & van der Meulen, M. C. H. (2015). In Vivo Axial Loading of the Mouse Tibia. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1226*, 99–115. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1619-1_9

Miles, R. R., Turner, C. H., Santerre, R., Tu, Y., Mcclelland, P., Argot, J., Dehoff, B. S., Mundy, C. W., Rosteck, P. R., Bidwell, J., Sluka, J. P., Hock, J., & Onyia, J. E. (1998). Analysis of differential gene expression in rat tibia after an osteogenic stimulus in vivo: Mechanical loading regulates osteopontin and myeloperoxidase. *Journal of Cellular Biochemistry*, *68*(3), 355–365. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4644(19980301)68:3<355::AID-JCB6>3.0.CO;2-T

Minematsu, A., Nishii, Y., Imagita, H., & Sakata, S. (2019a). Whole body vibration at low-frequency can increase trabecular thickness and width in adult rats. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, *19*(2), 169–177.

Minematsu, A., Nishii, Y., Imagita, H., & Sakata, S. (2019b). Possible effects of whole body vibration on bone properties in growing rats. *Osteoporosis and Sarcopenia*, *5*(3), 78–83. https://doi.org/10.1016/j.afos.2019.07.001

Mitsui, N., Suzuki, N., Maeno, M., Mayahara, K., Yanagisawa, M., Otsuka, K., & Shimizu, N. (2005). Optimal compressive force induces bone formation via increasing bone sialoprotein and prostaglandin E2 production appropriately. *Life Sciences*, *77*(25), 3168–3182. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.03.037

Miyauchi, A., Alvarez, J., Greenfield, E. M., Teti, A., Grano, M., Colucci, S., Zambonin-Zallone, A., Ross, F. P., Teitelbaum, S. L., & Cheresh, D. (1991). Recognition of osteopontin and related peptides by an alpha v beta 3 integrin stimulates immediate cell signals in osteoclasts. *Journal of Biological Chemistry*, *266*(30), 20369–20374.

Morinobu, M., Ishijima, M., Rittling, S. R., Tsuji, K., Yamamoto, H., Nifuji, A., Denhardt, D. T., & Noda, M. (2003). Osteopontin Expression in Osteoblasts and Osteocytes During Bone Formation Under Mechanical Stress in the Calvarial Suture In Vivo. *Journal of Bone and Mineral Research*, *18*(9), 1706–1715. https://doi.org/10.1359/jbmr.2003.18.9.1706

Nabavi, N., Khandani, A., Camirand, A., & Harrison, R. E. (2011). Effects of microgravity on osteoclast bone resorption and osteoblast cytoskeletal organization and adhesion. *Bone*, *49*(5), 965–974. https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.07.036

Nampei, A., Hashimoto, J., Hayashida, K., Tsuboi, H., Shi, K., Tsuji, I., Miyashita, H., Yamada, T., Matsukawa, N., Matsumoto, M., Morimoto, S., Ogihara, T., Ochi, T., & Yoshikawa, H. (2004). Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) is highly expressed in osteocytes in

human bone. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, *22*(3), 176–184. https://doi.org/10.1007/s00774-003-0468-9

Naumann, F. L., Bennell, K. L., & Wark, J. D. (2001). The effects of +Gz force on the bone mineral density of fighter pilots. *Aviation, Space, and Environmental Medicine*, *72*(3), 177–181.

Naumann, F. L., Grant, M. C., & Dhaliwal, S. S. (2004). Changes in Cervical Spine Bone Mineral Density in Response to Flight Training. *Aviation, Space, and Environmental Medicine*, *75*(3), 255–259.

Ogbureke, K. U. E., & Fisher, L. W. (2007). SIBLING Expression Patterns in Duct Epithelia Reflect the Degree of Metabolic Activity. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *55*(4), 403–409. https://doi.org/10.1369/jhc.6A7075.2007

Owan, I., Burr, D. B., Turner, C. H., Qiu, J., Tu, Y., Onyia, J. E., & Duncan, R. L. (1997). Mechanotransduction in bone: Osteoblasts are more responsive to fluid forces than mechanical strain. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *273*(3), C810–C815. https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.273.3.C810

Paniccia, R., Colucci, S., Grano, M., Serra, M., Zallone, A. Z., & Teti, A. (1993). Immediate cell signal by bone-related peptides in human osteoclast-like cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *265*(5), C1289–C1297. https://doi.org/10.1152/ajpcell.1993.265.5.C1289

Park, S.-H., Sim, W. Y., Min, B.-H., Yang, S. S., Khademhosseini, A., & Kaplan, D. L. (2012). Chip-Based Comparison of the Osteogenesis of Human Bone Marrow- and Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells under Mechanical Stimulation. *PLOS ONE*, *7*(9), e46689. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046689

Pasqualini, M., Lavet, C., Elbadaoui, M., Vanden-Bossche, A., Laroche, N., Gnyubkin, V., & Vico, L. (2013). Skeletal site-specific effects of whole body vibration in mature rats: From deleterious to beneficial frequency-dependent effects. *Bone*, *55*(1), 69–77. https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.03.013

Pegoraro, A. F., Janmey, P., & Weitz, D. A. (2017). Mechanical Properties of the Cytoskeleton and Cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *9*(11), a022038. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022038

Pei, S., Parthasarathy, S., Parajuli, A., Martinez, J., Lv, M., Jiang, S., Wu, D., Wei, S., Lu, X. L., Farach-Carson, M. C., Kirn-Safran, C. B., & Wang, L. (2020). Perlecan/Hspg2 deficiency impairs bone's calcium signaling and associated transcriptome in response to mechanical loading. *Bone*, *131*, 115078. https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.115078

Peres-Ueno, M. J., Stringhetta-Garcia, C. T., Castoldi, R. C., Ozaki, G. A. T., Chaves-Neto, A. H., Dornelles, R. C. M., & Louzada, M. J. Q. (2017). Model of hindlimb unloading in adult female rats: Characterizing bone physicochemical, microstructural, and biomechanical properties. *PLOS ONE*, *12*(12), e0189121. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189121

Petersen, D. N., Tkalcevic, G. T., Mansolf, A. L., Rivera-Gonzalez, R., & Brown, T. A. (2000). Identification of Osteoblast/Osteocyte Factor 45 (OF45), a Bone-specific cDNA Encoding an RGD-containing Protein That Is Highly Expressed in Osteoblasts and Osteocytes *. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(46), 36172–36180. https://doi.org/10.1074/jbc.M003622200

Peuriere, L. (2021). *Rôle des ostéocytes dans la perte osseuse d'immobilisation, préparation du vol spatial BION M2* [These en préparation, Lyon]. http://www.theses.fr/s194033

Prisby, R. D., Lafage-Proust, M.-H., Malaval, L., Belli, A., & Vico, L. (2008). Effects of whole body vibration on the skeleton and other organ systems in man and animal models: What we know and what we need to know. *Ageing Research Reviews*, *7*(4), 319–329. https://doi.org/10.1016/j.arr.2008.07.004

Qin, C., Brunn, J. C., Cook, R. G., Orkiszewski, R. S., Malone, J. P., Veis, A., & Butler, W. T. (2003). Evidence for the Proteolytic Processing of Dentin Matrix Protein 1: IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PROCESSED FRAGMENTS AND CLEAVAGE SITES *. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(36), 34700–34708. https://doi.org/10.1074/jbc.M305315200

Qin, C., Huang, B., Wygant, J. N., McIntyre, B. W., McDonald, C. H., Cook, R. G., & Butler, W. T. (2006). A Chondroitin Sulfate Chain Attached to the Bone Dentin Matrix Protein 1 NH2-Terminal Fragment *. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(12), 8034–8040. https://doi.org/10.1074/jbc.M512964200

Qin, Liu, W., Cao, H., & Xiao, G. (2020). Molecular mechanosensors in osteocytes. *Bone Research*, *8*(1), 23. https://doi.org/10.1038/s41413-020-0099-y

Qin, Rubin, C. T., & McLeod, K. J. (1998). Nonlinear dependence of loading intensity and cycle number in the maintenance of bone mass and morphology. *Journal of Orthopaedic Research*, *16*(4), 482–489. https://doi.org/10.1002/jor.1100160414

Raynal, C., Delmas, P. D., & Chenu, C. (1996). Bone sialoprotein stimulates in vitro bone resorption. *Endocrinology*, *137*(6), 2347–2354. https://doi.org/10.1210/en.137.6.2347

Reynolds, R. P., Li, Y., Garner, A., & Norton, J. N. (2018). Vibration in mice: A review of comparative effects and use in translational research. *Animal Models and Experimental Medicine*, *1*(2), 116–124. https://doi.org/10.1002/ame2.12024

Rittling, S. R., Matsumoto, H. N., Mckee, M. D., Nanci, A., An, X.-R., Novick, K. E., Kowalski, A. J., Noda, M., & Denhardt, D. T. (1998). Mice Lacking Osteopontin Show Normal Development and Bone Structure but Display Altered Osteoclast Formation In Vitro. *Journal of Bone and Mineral Research*, *13*(7), 1101–1111. https://doi.org/10.1359/jbmr.1998.13.7.1101

Robling, A. G., & Bonewald, L. F. (2020). The Osteocyte: New Insights. *Annual Review of Physiology*, *82*(1), 485–506. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021119-034332

Robling, A. G., Daly, R., Fuchs, R. K., & Burr, D. B. (2019). Mechanical Adaptation. In *Basic and Applied Bone Biology* (pp. 203–233). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813259-3.00011-7

Rochefort, G. Y., Pallu, S., & Benhamou, C. L. (2010). Osteocyte: The unrecognized side of bone tissue. *Osteoporosis International*, *21*(9), 1457–1469. https://doi.org/10.1007/s00198-010-1194-5

Ross, F. P., Chappel, J., Alvarez, J. I., Sander, D., Butler, W. T., Farach-Carson, M. C., Mintz, K. A., Robey, P. G., Teitelbaum, S. L., & Cheresh, D. A. (1993). Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin alpha v beta 3 potentiate bone resorption. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(13), 9901–9907.

Rowe, P. S. N. (2012a). The chicken or the egg: PHEX, FGF23 and SIBLINGs unscrambled. *Cell Biochemistry and Function*, *30*(5), 355–375. https://doi.org/10.1002/cbf.2841

Rowe, P. S. N. (2012b). Regulation of bone-renal mineral and energy metabolism: The PHEX, FGF23, DMP1, MEPE ASARM pathway. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, *22*(1), 61–86. https://doi.org/10.1615/critreveukargeneexpr.v22.i1.50

Rowe, P. S. N., de Zoysa, P. A., Dong, R., Wang, H. R., White, K. E., Econs, M. J., & Oudet, C. L. (2000). MEPE, a New Gene Expressed in Bone Marrow and Tumors Causing Osteomalacia. *Genomics*, *67*(1), 54–68. https://doi.org/10.1006/geno.2000.6235

Rowe, P. S. N., Matsumoto, N., Jo, O. D., Shih, R. N. J., Oconnor, J., Roudier, M. P., Bain, S., Liu, S., Harrison, J., & Yanagawa, N. (2006). Correction of the mineralization defect in hyp mice treated with protease inhibitors CA074 and pepstatin. *Bone*, *39*(4), 773–786. https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.04.012

Roy, M., & Roux, S. (2020). Rab GTPases in Osteoclastic Bone Resorption and Autophagy. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(20), 7655. https://doi.org/10.3390/ijms21207655

Rucci, N., Rufo, A., Alamanou, M., & Teti, A. (2007). Modeled microgravity stimulates osteoclastogenesis and bone resorption by increasing osteoblast RANKL/OPG ratio. *Journal of Cellular Biochemistry*, *100*(2), 464–473. https://doi.org/10.1002/jcb.21059

Sample, S. J., Behan, M., Smith, L., Oldenhoff, W. E., Markel, M. D., Kalscheur, V. L., Hao, Z., Miletic, V., & Muir, P. (2008). Functional Adaptation to Loading of a Single Bone Is Neuronally Regulated and Involves Multiple Bones. *Journal of Bone and Mineral Research*, *23*(9), 1372–1381. https://doi.org/10.1359/jbmr.080407

Sample, S. J., Collins, R. J., Wilson, A. P., Racette, M. A., Behan, M., Markel, M. D., Kalscheur, V. L., Hao, Z., & Muir, P. (2010). Systemic effects of ulna loading in male rats during functional adaptation. *Journal of Bone and Mineral Research*, *25*(9), 2016–2028. https://doi.org/10.1002/jbmr.101

Seldeen, K. L., Redae, Y. Z., Thiyagarajan, R., Berman, R. N., Leiker, M. M., & Troen, B. R. (2019). Short Session High Intensity Interval Training and Treadmill Assessment in Aged Mice. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, *144*, e59138. https://doi.org/10.3791/59138

Sharma, D., Ciani, C., Marin, P. A. R., Levy, J. D., Doty, S. B., & Fritton, S. P. (2012). Alterations in the osteocyte lacunar–canalicular microenvironment due to estrogen deficiency. *Bone*, *51*(3), 488–497. https://doi.org/10.1016/j.bone.2012.05.014

Shi, C., Ma, N., Zhang, W., Ye, J., Shi, H., Xiang, D., Wu, C., Song, L., Zhang, N., & Liu, Q. (2020). Haploinsufficiency of Dspp Gene Causes Dentin Dysplasia Type II in Mice. *Frontiers in Physiology*, *0*. https://doi.org/10.3389/fphys.2020.593626

Shimizu, E., Matsuda-Honjyo, Y., Samoto, H., Saito, R., Nakajima, Y., Nakayama, Y., Kato, N., Yamazaki, M., & Ogata, Y. (2004). Static magnetic fields-induced bone sialoprotein (BSP) expression is mediated through FGF2 response element and pituitary-specific transcription factor-1 motif. *Journal of Cellular Biochemistry*, *91*(6), 1183–1196. https://doi.org/10.1002/jcb.20002

Shimomura, M., Yumoto, A., Ota-Murakami, N., Kudo, T., Shirakawa, M., Takahashi, S., Morita, H., & Shiba, D. (2021). Study of mouse behavior in different gravity environments. *Scientific Reports*, *11*(1), 2665. https://doi.org/10.1038/s41598-021-82013-w

Shipov, A., Zaslansky, P., Riesemeier, H., Segev, G., Atkins, A., & Shahar, R. (2013). Unremodeled endochondral bone is a major architectural component of the cortical bone of the rat (Rattus norvegicus). *Journal of Structural Biology*, *183*(2), 132–140. https://doi.org/10.1016/j.jsb.2013.04.010

Smith, S. M., Zwart, S. R., Heer, M. A., Baecker, N., Evans, H. J., Feiveson, A. H., Shackelford, L. C., & LeBlanc, A. D. (2009). Effects of artificial gravity during bed rest on bone metabolism in humans. *Journal of Applied Physiology*, *107*(1), 47–53. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.91134.2008

Sodek, J., Ganss, B., & McKee, M. D. (2000). Osteopontin. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, *11*(3), 279–303. https://doi.org/10.1177/10454411000110030101

Sreenath, T., Thyagarajan, T., Hall, B., Longenecker, G., D'Souza, R., Hong, S., Wright, J. T., MacDougall, M., Sauk, J., & Kulkarni, A. B. (2003). Dentin Sialophosphoprotein Knockout Mouse Teeth Display Widened Predentin Zone and Develop Defective Dentin Mineralization Similar to Human Dentinogenesis Imperfecta Type III. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(27), 24874–24880. https://doi.org/10.1074/jbc.M303908200

Staines, K. A., MacRae, V. E., & Farquharson, C. (2012). The importance of the SIBLING family of proteins on skeletal mineralisation and bone remodelling. *The Journal of Endocrinology*, *214*(3), 241–255. https://doi.org/10.1530/joe-12-0143

Standal, T., Børset, M., & Sundan, A. (2004). Standal T, Borset M, Sundan ARole of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. Exp Oncol 26: 179-184. *Experimental Oncology*, *26*, 179–184.

Stanford, C. M., & Brand, R. A. (1999). Toward an understanding of implant occlusion and strain adaptive bone modeling and remodeling. *Journal of Prosthetic Dentistry*, *81*(5), 553–561. https://doi.org/10.1016/S0022-3913(99)70209-X

Stern, A. R., Yao, X., Wang, Y., Berhe, A., Dallas, M., Johnson, M. L., Yao, W., Kimmel, D. B., & Lane, N. E. (2018). Effect of osteoporosis treatment agents on the cortical bone osteocyte microenvironment in adult estrogen-deficient, osteopenic rats. *Bone Reports*, *8*, 115–124. https://doi.org/10.1016/j.bonr.2018.02.005

Sugiyama, T., Price, J. S., & Lanyon, L. E. (2010). Functional adaptation to mechanical loading in both cortical and cancellous bone is controlled locally and is confined to the loaded bones. *Bone*, *46*(2), 314–321. https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.08.054

Sun, Chen, L., Ma, S., Zhou, J., Zhang, H., Feng, J. Q., & Qin, C. (2011). Roles of DMP1 Processing in Osteogenesis, Dentinogenesis and Chondrogenesis. *Cells Tissues Organs*, *194*(2–4), 199–204. https://doi.org/10.1159/000324672

Sun, Chi, S., Li, Y., Ling, S., Tan, Y., Xu, Y., Jiang, F., Li, J., Liu, C., Zhong, G., Cao, D., Jin, X., Zhao, D., Gao, X., Liu, Z., Xiao, B., & Li, Y. (2019). The mechanosensitive Piezo1 channel is required for bone formation. *ELife*, *8*, e47454. https://doi.org/10.7554/eLife.47454

Suniaga, S., Rolvien, T., vom Scheidt, A., Fiedler, I. A. K., Bale, H. A., Huysseune, A., Witten, P. E., Amling, M., & Busse, B. (2018). Increased mechanical loading through controlled swimming exercise induces bone formation and mineralization in adult zebrafish. *Scientific Reports*, *8*(1), 3646. https://doi.org/10.1038/s41598-018-21776-1

Suzuki, S., Sreenath, T., Haruyama, N., Honeycutt, C., Terse, A., Cho, A., Kohler, T., Müller, R., Goldberg, M., & Kulkarni, A. B. (2009). Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. *Matrix Biology*, *28*(4), 221–229. https://doi.org/10.1016/j.matbio.2009.03.006

Swift, J. M., Swift, S. N., Allen, M. R., & Bloomfield, S. A. (2014). Beta-1 Adrenergic Agonist Treatment Mitigates Negative Changes in Cancellous Bone Microarchitecture and Inhibits Osteocyte Apoptosis during Disuse. *PLOS ONE*, *9*(9), e106904. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106904

Tanaka-Kamioka, K., Kamioka, H., Ris, H., & Lim, S.-S. (1998). Osteocyte Shape Is Dependent on Actin Filaments and Osteocyte Processes Are Unique Actin-Rich Projections. *Journal of Bone and Mineral Research*, *13*(10), 1555–1568. https://doi.org/10.1359/jbmr.1998.13.10.1555

Tartaix, P. H., Doulaverakis, M., George, A., Fisher, L. W., Butler, W. T., Qin, C., Salih, E., Tan, M., Fujimoto, Y., Spevak, L., & Boskey, A. L. (2004). In Vitro Effects of Dentin Matrix Protein-1 on Hydroxyapatite Formation Provide Insights into in Vivo Functions *. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(18), 18115–18120. https://doi.org/10.1074/jbc.M314114200

Tatsumi, S., Ishii, K., Amizuka, N., Li, M., Kobayashi, T., Kohno, K., Ito, M., Takeshita, S., & Ikeda, K. (2007). Targeted Ablation of Osteocytes Induces Osteoporosis with Defective Mechanotransduction. *Cell Metabolism*, *5*(6), 464–475. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.05.001

Temiyasathit, S., Tang, W. J., Leucht, P., Anderson, C. T., Monica, S. D., Castillo, A. B., Helms, J. A., Stearns, T., & Jacobs, C. R. (2012). Mechanosensing by the Primary Cilium: Deletion of

Kif3A Reduces Bone Formation Due to Loading. *PLOS ONE*, *7*(3), e33368. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033368

Terai, K., Takano-Yamamoto, T., Ohba, Y., Hiura, K., Sugimoto, M., Sato, M., Kawahata, H., Inaguma, N., Kitamura, Y., & Nomura, S. (1999). Role of Osteopontin in Bone Remodeling Caused by Mechanical Stress. *Journal of Bone and Mineral Research*, *14*(6), 839–849. https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.6.839

Thi, M. M., Suadicani, S. O., Schaffler, M. B., Weinbaum, S., & Spray, D. C. (2013). Mechanosensory responses of osteocytes to physiological forces occur along processes and not cell body and require αVβ3 integrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(52), 21012–21017. https://doi.org/10.1073/pnas.1321210110

Thompson, W. R., Majid, A. S., Czymmek, K. J., Ruff, A. L., García, J., Duncan, R. L., & Farach-Carson, M. C. (2011). Association of the α2δ1 subunit with Cav3.2 enhances membrane expression and regulates mechanically induced ATP release in MLO-Y4 osteocytes. *Journal of Bone and Mineral Research*, *26*(9), 2125–2139. https://doi.org/10.1002/jbmr.437

Thompson, W. R., Rubin, C. T., & Rubin, J. (2012). Mechanical regulation of signaling pathways in bone. *Gene*, *503*(2), 179–193. https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.04.076

Tiede-Lewis, L. M., Xie, Y., Hulbert, M. A., Campos, R., Dallas, M. R., Dusevich, V., Bonewald, L. F., & Dallas, S. L. (2017). Degeneration of the osteocyte network in the C57BL/6 mouse model of aging. *Aging (Albany NY)*, *9*(10), 2190–2208. https://doi.org/10.18632/aging.101308

Tokarz, D., Martins, J. S., Petit, E. T., Lin, C. P., Demay, M. B., & Liu, E. S. (2018). Hormonal Regulation of Osteocyte Perilacunar and Canalicular Remodeling in the Hyp Mouse Model of X-Linked Hypophosphatemia: OSTEOCYTE PERILACUAR AND CANALICULAR REMODELING IN HYP MICE. *Journal of Bone and Mineral Research*, *33*(3), 499–509. https://doi.org/10.1002/jbmr.3327

Tominari, T., Ichimaru, R., Taniguchi, K., Yumoto, A., Shirakawa, M., Matsumoto, C., Watanabe, K., Hirata, M., Itoh, Y., Shiba, D., Miyaura, C., & Inada, M. (2019). Hypergravity and microgravity exhibited reversal effects on the bone and muscle mass in mice. *Scientific Reports*, *9*(1), 6614. https://doi.org/10.1038/s41598-019-42829-z

Tortora, G. J., & Grabowski, S. R. (1994). *Principes d'anatomie et de physiologie*. De Boeck.

Truesdell, S. L., Saunders, M. M., Truesdell, S. L., & Saunders, M. M. (2020). Bone remodeling platforms: Understanding the need for multicellular lab-on-a-chip systems and predictive agent-based models. *Mathematical Biosciences and Engineering*, *17*(2), 1233–1252. https://doi.org/10.3934/mbe.2020063

Tsuchiya, S., Simmer, J. P., Hu, J. C.-C., Richardson, A. S., Yamakoshi, F., & Yamakoshi, Y. (2011). Astacin proteases cleave dentin sialophosphoprotein (Dspp) to generate dentin phosphoprotein (Dpp). *Journal of Bone and Mineral Research*, *26*(1), 220–228. https://doi.org/10.1002/jbmr.202

Tye, C. E., Hunter, G. K., & Goldberg, H. A. (2005). Identification of the Type I Collagen-binding Domain of Bone Sialoprotein and Characterization of the Mechanism of Interaction *. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(14), 13487–13492. https://doi.org/10.1074/jbc.M408923200

Vahidi, G., Rux, C., Sherk, V. D., & Heveran, C. M. (2020). Lacunar-canalicular bone remodeling: Impacts on bone quality and tools for assessment. *Bone*, 115663. https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115663

Valverde, P., Tu, Q., & Chen, J. (2005). BSP and RANKL Induce Osteoclastogenesis and Bone Resorption Synergistically. *Journal of Bone and Mineral Research*, *20*(9), 1669–1679. https://doi.org/10.1359/JBMR.050511

Valverde, P., Zhang, J., Fix, A., Zhu, J., Ma, W., Tu, Q., & Chen, J. (2008). Overexpression of Bone Sialoprotein Leads to an Uncoupling of Bone Formation and Bone Resorption in Mice.

Journal of Bone and Mineral Research, *23*(11), 1775–1788. https://doi.org/10.1359/jbmr.080605

Venkatesh, D. (2017). Primary cilia. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP*, *21*(1), 8–10. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_48_17

Verdelis, K., Ling, Y., Sreenath, T., Haruyama, N., MacDougall, M., van der Meulen, M. C. H., Lukashova, L., Spevak, L., Kulkarni, A. B., & Boskey, A. L. (2008). DSPP effects on in vivo bone mineralization. *Bone*, *43*(6), 983–990. https://doi.org/10.1016/j.bone.2008.08.110

Vico, L., & Hargens, A. (2018). Skeletal changes during and after spaceflight. *Nature Reviews Rheumatology*, *14*(4), 229–245. https://doi.org/10.1038/nrrheum.2018.37

Wade-Gueye, N. M., Boudiffa, M., Laroche, N., Vanden-Bossche, A., Fournier, C., Aubin, J. E., Vico, L., Lafage-Proust, M.-H., & Malaval, L. (2010). Mice Lacking Bone Sialoprotein (BSP) Lose Bone after Ovariectomy and Display Skeletal Site-Specific Response to Intermittent PTH Treatment. *Endocrinology*, *151*(11), 5103–5113. https://doi.org/10.1210/en.2010-0091

Wang. (2018). Solute Transport in the Bone Lacunar-Canalicular System (LCS). *Current Osteoporosis Reports*, *16*(1), 32–41. https://doi.org/10.1007/s11914-018-0414-3

Wang, Lai, X., Price, C., Thompson, W. R., Li, W., Quabili, T. R., Tseng, W.-J., Liu, X. S., Zhang, H., Pan, J., Kirn-Safran, C. B., Farach-Carson, M. C., & Wang, L. (2014). Perlecan-Containing Pericellular Matrix Regulates Solute Transport and Mechanosensing Within the Osteocyte Lacunar-Canalicular System. *Journal of Bone and Mineral Research*, *29*(4), 878–891. https://doi.org/10.1002/jbmr.2105

Wang, You, X., Lotinun, S., Zhang, L., Wu, N., & Zou, W. (2020). Mechanical sensing protein PIEZO1 regulates bone homeostasis via osteoblast-osteoclast crosstalk. *Nature Communications*, *11*(1), 282. https://doi.org/10.1038/s41467-019-14146-6

Weber, G. F., Ashkar, S., Glimcher, M. J., & Cantor, H. (1996). Receptor-Ligand Interaction Between CD44 and Osteopontin (Eta-1). *Science*, *271*(5248), 509–512. https://doi.org/10.1126/science.271.5248.509

Wehrle, E., Liedert, A., Heilmann, A., Wehner, T., Bindl, R., Fischer, L., Haffner-Luntzer, M., Jakob, F., Schinke, T., Amling, M., & Ignatius, A. (2015). The impact of low-magnitude high-frequency vibration on fracture healing is profoundly influenced by the oestrogen status in mice. *Disease Models & Mechanisms*, *8*(1), 93–104. https://doi.org/10.1242/dmm.018622

Wehrle, E., Wehner, T., Heilmann, A., Bindl, R., Claes, L., Jakob, F., Amling, M., & Ignatius, A. (2014). Distinct frequency dependent effects of whole-body vibration on non-fractured bone and fracture healing in mice. *Journal of Orthopaedic Research*, *32*(8), 1006–1013. https://doi.org/10.1002/jor.22629

Weinbaum, S., Cowin, S. C., & Zeng, Y. (1994). A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses. *Journal of Biomechanics*, *27*(3), 339–360. https://doi.org/10.1016/0021-9290(94)90010-8

Weinstein, R. S., Jilka, R. L., Parfitt, A. M., & Manolagas, S. C. (1998). Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *Journal of Clinical Investigation*, *102*(2), 274–282. https://doi.org/10.1172/JCI2799

Wenger, K. H., Freeman, J. D., Fulzele, S., Immel, D. M., Powell, B. D., Molitor, P., Chao, Y. J., Gao, H.-S., Elsalanty, M., Hamrick, M. W., Isales, C. M., & Yu, J. C. (2010). Effect of whole-body vibration on bone properties in aging mice. *Bone*, *47*(4), 746–755. https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.07.014

Yamakoshi, Y. (2009). Dentinogenesis and Dentin Sialophosphoprotein (DSPP). *Journal of Oral Biosciences*, *51*(3), 134–142. https://doi.org/10.1016/S1349-0079(09)80021-2

Ye, J., Wang, Y., Zhu, Q., Shi, H., Xiang, D., Wu, C., Song, L., Ma, N., Liu, Q., & Zhang, W. (2021). Primary observation of the role of posttranslational modification of dentin sialophosphoprotein (DSPP) on postnatal development of mandibular condyle in mice. *Archives of Oral Biology*, *125*, 105086. https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2021.105086

Yokosaki, Y., Tanaka, K., Higashikawa, F., Yamashita, K., & Eboshida, A. (2005). Distinct structural requirements for binding of the integrins αvβ6, αvβ3, αvβ5, α5β1 and α9β1 to osteopontin. *Matrix Biology*, *24*(6), 418–427. https://doi.org/10.1016/j.matbio.2005.05.005

Yoshitake, H., Rittling, S. R., Denhardt, D. T., & Noda, M. (1999). Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(14), 8156–8160.

You, J., Reilly, G. C., Zhen, X., Yellowley, C. E., Chen, Q., Donahue, H. J., & Jacobs, C. R. (2001). Osteopontin Gene Regulation by Oscillatory Fluid Flow via Intracellular Calcium Mobilization and Activation of Mitogen-activated Protein Kinase in MC3T3–E1 Osteoblasts *. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(16), 13365–13371. https://doi.org/10.1074/jbc.M009846200

Yu, H., Ren, Y., Sandham, A., Ren, A., Huang, L., & Bai, D. (2009). Mechanical Tensile Stress Effects on the Expression of Bone Sialoprotein in Bovine Cementoblasts. *The Angle Orthodontist*, *79*(2), 346–352. https://doi.org/10.2319/011508-20.1

Yu, Sellman, D. P., Bahraini, A., Hagan, M. L., Elsherbini, A., Vanpelt, K. T., Marshall, P. L., Hamrick, M. W., McNeil, A., McNeil, P. L., & McGee-Lawrence, M. E. (2018). Mechanical loading disrupts osteocyte plasma membranes which initiates mechanosensation events in bone. *Journal of Orthopaedic Research*, *36*(2), 653–662. https://doi.org/10.1002/jor.23665

Yuan, Y., Jagga, S., Martins, J. S., Rana, R., Pajevic, P. D., & Liu, E. S. (2021). Impaired 1,25 dihydroxyvitamin D3 action and hypophosphatemia underlie the altered lacuno-canalicular remodeling observed in the Hyp mouse model of XLH. *PLOS ONE*, *16*(5), e0252348. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252348

Zeng, Q. Q., Jee, W. S. S., Bigornia, A. E., King, J. G., D'Souza, S. M., Li, X. J., Ma, Y. F., & Wechter, W. J. (1996). Time responses of cancellous and cortical bones to sciatic neurectomy in growing female rats. *Bone*, *19*(1), 13–21. https://doi.org/10.1016/8756-3282(96)00112-3

Zhang, L., Yuan, Y., Wu, W., Sun, Z., Lei, L., Fan, J., Gao, B., & Zou, J. (2020). Medium-Intensity Treadmill Exercise Exerts Beneficial Effects on Bone Modeling Through Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *0*. https://doi.org/10.3389/fcell.2020.600639

Zhou, S., Zu, Y., Sun, Z., Zhuang, F., & Yang, C. (2015). Effects of Hypergravity on Osteopontin Expression in Osteoblasts. *PLOS ONE*, *10*(6), e0128846. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128846

Zhu, X.-L., Ganss, B., Goldberg, H. A., & Sodek, J. (2001). Synthesis and processing of bone sialoproteins during de novo bone formation in vitro. *Biochemistry and Cell Biology*, *79*(6), 737–746. https://doi.org/10.1139/o01-146

V) Annexes méthodologiques

A. Histomorphométrie de l'os cortical inclus en méthyl-méthacrylate

Protocole HM-9

Histomorphométrie de l'os cortical de fémur en MMA	*par :*	M.Maalouf
	le :	30/06/2020
	n° version :	01

REMARQUES HYGIENE ET SECURITE :

Gants + blouse pendant les étapes de préparation des échantillons et de montage.

PRINCIPE :

Préparation et lecture des marquages tétracycline et détection de la TRAcP sur coupe transversale d'os cortical en MMA

MATERIEL ET METHODE :

- Solution de MMA
- Solution d'initiation (solution à préparer*)
- Pilulier en verre
- Scie à fil et ponceuse à eau (Escil)
- Tampon Acétate de Na (solution à préparer*)
- Naphtol AS-TR Phosphate (Sigma N6125 / 1 g)
- Fast Violet B Salt (Aldrich 414-273-3850 / 5 g -> 16-5-18= l'actuel)
- Fluorure de Na (solution à préparer*)
- Permount (Fisher SP 15-500)

*** Préparation des solutions**

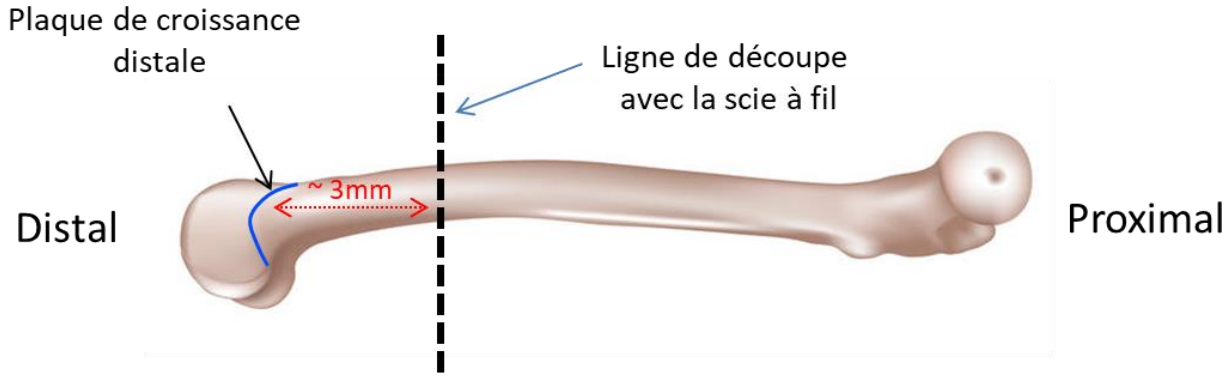
Solution d'initiation	Tampon Acétate de de Na (pH = 5).	Fluorure de Na
- **2-Propanol 19ml** (Emplura K49672566747 / 1L) - **N,N-Dimethylanilin 1 ml** (Merck-Schuchardt Art.803060 / 1L)	- **Acétate de Na 19g** (Sigma S-7670 / 1KG) - **Acide acétique 4.5 ml** - **Eau distillée 1 litre** - **Tartrate de Na 150 mg** (Merck Art. 6663 / 250 g)	- **Fluorure de Na 4.2 g** (Chemicals 27858.290 / 1KG) - **Eau distillée 1 litre**

TECHNIQUE :

Préparation de l'os

Couper à la scie à fil l'extrémité distale de l'os, au-dessus de la métaphyse (à environ 3 mm au-dessus de la plaque de croissance distale). Eviter d'utiliser la Dremel ou un scalpel car les échantillons seront abimés.

La suite du protocole est dédiée uniquement à la partie proximale (contenant l'os cortical du midshaft). Le protocole d'inclusion, de coupe et d'analyse pour la partie distale (trabéculaire de la métaphyse) est décrit dans un autre protocole au laboratoire.



Procéder à la déshydratation de l'os :

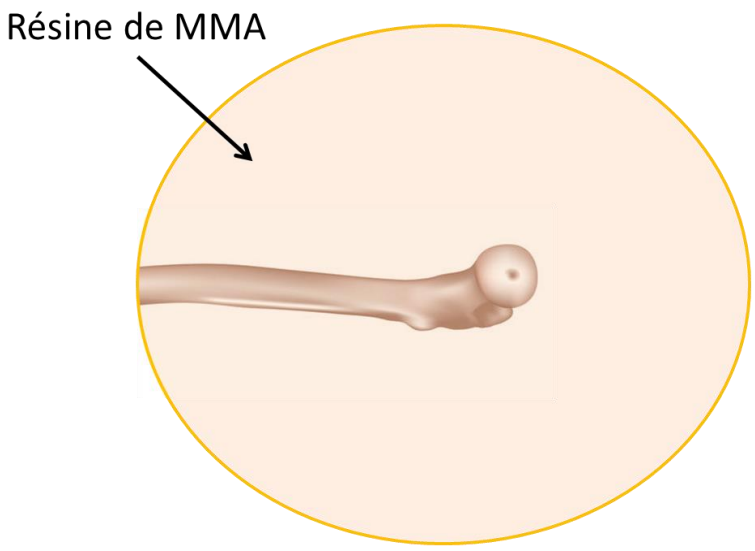
- 1er bain : alcool 90%. Conserver à 4°C pendant 1 jour.
- 2ème bain : alcool 100% + 30 min sous vide. Conserver à 4°C pendant 2 jours.
- 3ème bain : alcool 100% + 30 min sous vide. Conserver à 4°C pendant 2 jours.

Procéder à l'imprégnation de l'os (ne jamais boucher les piluliers pendant cette étape) :

- 1er bain : 5 ml de MMA + 30 min sous vide. Conserver à -20°C pendant 7 jours.
- 2ème bain : 5 ml de MMA + 80 µl de solution d'initiation + 30 min sous vide. Conserver à -20°C pendant 3 jours.
- 3ème bain : 5 ml de MMA + 80 µl de solution d'initiation + 30 min sous vide. Conserver à -20°C pendant 3 jours.

Procéder à l'inclusion de l'os :

- Remplir de MMA le ¾ d'un pilulier en verre.
- Positionner l'os au fond du pilulier de manière à avoir l'extrémité proximale (articulation avec la hanche) au centre et l'extrémité distale (qui est déjà découpée) proche du bord.
- Rajouter 380 µl de solution d'initiation.
- Boucher le pilulier en chassant l'air.
- Mettre à 4°C dans un bain marie pour une nuit.

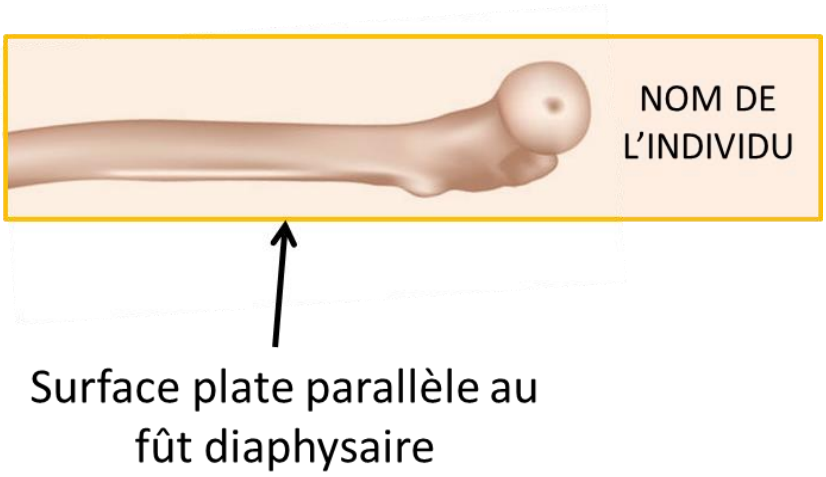


Positionnement de l'os dans le fond du pilulier (vue du dessus)

Préparer l'échantillon pour la coupe :

- Scier puis poncer le bloc de manière à obtenir l'os dans une allumette de MMA : faire en sorte que l'os soit au milieu de l'allumette, loin des bords. De même poncer de manière à ce que la surface soit parallèle au fût diaphysaire (pour faciliter l'orientation

lors de la coupe à la scie à fil). Garder de la MMA au-dessus de la partie proximale du fémur pour écrire le nom de l'individu et pour faciliter le collage sur la plateforme de la scie à fil.



Réaliser des coupes transversales de la corticale :

- Découper l'os transversalement en tranches de 300 µm grâce au fil diamanté en partant de la partie proximale. Il est possible de descendre à 200 µm mais la manipulation des coupes devient délicate.
- Déposer les tranches dans l'alcool absolu dans chaque puit d'une plaque de 48 puits (les coupes peuvent ainsi être sériées).

Lecture de la tétracycline

- Mettre une coupe sur une lame en y déposant régulièrement des gouttes d'alcool pour la garder la plus plate possible.
- Prendre en photo la coupe avant d'effectuer les analyses car pendant l'analyse la la lumière fluorescente va atténuer le marquage.
- Sur le logiciel propre « Morphométrie » du LBTO, sélectionner le grossissement 10X (TV= 2,25 mm^2) en utilisant le **même BV/TV et Tb.Th pour toutes les coupes** (exemple BV/TV = 20% ; Tb.Th = 0,08 mm). **Toutes les mesures doivent être faites sans changement de champ**.
- Cliquer sur « épaisseur » puis « vitesse de minéralisation » et rentrer le nombre de jour séparant les 2 injections de tétracycline.
- Mesurer soit la distance entre les 2 lignes soit l'épaisseur totale du marquage si les 2 lignes sont très proches. Effectuer cette mesure sur le périoste et l'endoste séparément.
- Cliquer sur « surfaces marquées ».
- Mesurer la longueur totale d'une interface (endoste ou périoste) avec la fonction « simple marquage » (sLs/BS ; bouton jaune sur la souris).

- Mesurer la surface marquée par tétracycline de la même interface avec la fonction double marquage (dLs/BS ; bouton blanc sur la souris).
- Calculer **dLs/Bs ÷ sLs/Bs * 100** pour obtenir le pourcentage de surface marquée.
- Effectuer ces mesures pour l'endoste et le périoste séparément puis refaire toutes les mesures sur l'autre face de la coupe et faire la moyenne.

Coloration pour la détection de la TRAcP

- Réhydrater progressivement les coupes en les passants de l'alcool 100% à l'alcool 50% puis dans de l'eau déminéralisée.
- Préparer un bécher 50 ml : 50 ml de tampon Acétate de Na + 100 mg de Naphtol AS-TR
- Préparer un bécher 50 ml : 50 ml de tampon Acétate de Na + (250 mg si Sigma-Aldrich-> avec source actuelle (16-5-18) = 350mg+filtrer!) de Fast Violet
- Agiter et attendre la dissolution des 2 produits.
- Mélanger les 2 solutions, une floculation jaune se produit.
- Ajouter à chaque puit 1 ml de ce mélange.
- Mettre à 4°C pendant une nuit.
- Rinçage à l'eau courante puis déposer rapidement dans le Fluorure de Na et attendre minimum 30 minutes.
- Rinçage à l'eau courante.
- **Déshydrater à l'alcool absolu pendant 1h à 4°C**, puis tremper dans le méthycyclohexane et monter au Permount (mettre une quantité non négligeable).

Note :

Il est préférable pour ce genre de coupes de ne pas utiliser de contre-coloration (sauf si elle est très légère (30 secondes dans le colorant)) car elle peut altérer la visibilité de la coloration TRAcP en noircissant l'os. L'épaisseur de la coupe suffit pour distinguer facilement les cellules TRAcP+.

Lecture des surfaces ostéoclastiques (=cellules marquées par la TRAcP)

- Sur le logiciel « Morphométrie » propre du LBTO, sélectionner le grossissement 10X (TV= 2,25 mm^2) en utilisant le **même BV/TV et Tb.Th pour toutes les coupes** (exemple BV/TV = 20% ; Tb.Th = 0,08 mm). **Toutes les mesures doivent être faites sans changement de champ**.
- Cliquer sur « surfaces marquées ».
- Mesurer la longueur totale d'une interface (endoste ou périoste) avec la fonction « simple marquage » (sLs/BS ; bouton jaune sur la souris).
- Mesurer la surface des ostéoclastes (=surface marquée par la TRAcP) de la même interface avec la fonction double marquage (dLs/BS ; bouton blanc sur la souris).

- Calculer **dLs/Bs ÷ sLs/Bs * 100** pour obtenir le pourcentage de surface ostéoclastique.
- Effectuer ces étapes pour l'endoste et le périoste séparément puis refaire toutes les mesures sur l'autre face de la coupe et faire la moyenne.

Il est ainsi possible de comparer pour exactement un même niveau de l'os cortical les activités de formation et de résorption.

B. Paramètres d'acquisition des tranches d'os cortical multimarqué au microscope confocal à l'objectif 20X

Information acquisition image 20X confocal			
Microscope	Axio Observer.Z1 / 7		
Objectif	LD Plan-Neofluar 20x/0.4 Korr Ph 2 M27		
Track	Calcein	Fluorescein	Alizarin
Dye Name	DAPI	AF488	AF568
Bit Depth	16 Bit	16 Bit	16 Bit
Contrast method	Fluorescence	Fluorescence	Fluorescence
Scan Zoom	X : 0,5 Y : 0,5	X : 0,5 Y : 0,5	X : 0,5 Y : 0,5
Scan Mode	Frame	Frame	Frame
Scan Direction	Bidirectional	Bidirectional	Bidirectional
Pinhole	298 µm	298 µm	298 µm
Laser Wavelength	405 nm	488 nm	561 nm
Laser Blanking	Enabled	Enabled	Enabled
Excitation Wavelength	353	493	577
Emission Wavelength	465	517	603
Detection Wavelength	400-499	497-566	565-635
Imaging Device	Airyscan	Airyscan	Airyscan
Detector	GaAsP-PMT	GaAsP-PMT	GaAsP-PMT
Detector Gain	850 V	700 V	800 V
Detector offset	0	0	0
Detector Digital Gain	1	1	1
Airyscan Mode	Superrsolution : 9,7 (2D, Auto)	Superrsolution : 9,7 (2D, Auto)	Superrsolution : 9,7 (2D, Auto)
Processing	Stitching	Stitching	Stitching

Sauvegarde de l'acquisition sous format .czi

C. Paramètres d'acquisition du réseau lacuno-canaliculaire au microscope confocal à l'objectif 63X

Information acquisition image 63X confocal			
Microscope	Axio Observer.Z1 / 7		
Objectif	Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27		
Track	Calcein	Fluorescein	Alizarin
Dye Name	DAPI	AF488	AF568
Bit Depth	16 Bit	16 Bit	16 Bit
Contrast method	Fluorescence	Fluorescence	Fluorescence
Scan Zoom	X : 0,5 Y : 0,5	X : 0,5 Y : 0,5	X : 0,5 Y : 0,5
Scan Mode	Frame	Frame	Frame
Scan Direction	Bidirectional	Bidirectional	Bidirectional
Pinhole	267 µm	267 µm	267 µm
Laser Wavelength	405 nm	488 nm	561 nm
Laser Blanking	Enabled	Enabled	Enabled
Excitation Wavelength	353	493	577
Emission Wavelength	465	517	603
Detection Wavelength	400-499	497-566	565-635
Imaging Device	Airyscan	Airyscan	Airyscan
Detector	GaAsP-PMT	GaAsP-PMT	GaAsP-PMT
Detector Gain	850 V	800 V	850 V
Detector offset	0	0	0
Detector Digital Gain	5	1	1
Airyscan Mode	Superrsolution : 9,7 (2D, Auto)	Superrsolution : 9,7 (2D, Auto)	Superrsolution : 9,7 (2D, Auto)
Processing	Stitching + Stack Correction	Stitching + Stack Correction	Stitching + Stack Correction

Sauvegarde de l'acquisition sous format .czi

D. Quantification de la dynamique corticale avec ImageJ

Important : Le format .czi est déjà calibré pour ImageJ, les mesures donneront les résultats à la bonne échelle, pas besoin de réaliser une calibration.

- Ouvrir Image J
- Faites glisser l'image20X.czi dans la barre (Fiji Is Just) Image J, une fenêtre Bio-Formats Import Options s'ouvre automatiquement
- Sélectionner **Split Channel** et cliquer **OK**
- Sur la barre (Fiji Is Just) Image J, cliquer sur **Image → Color → Merge Channel**. Une fenêtre Merge Channels s'ouvre
- Dans la rubrique **C1 (red)** sélectionner le canal **C=0**
- Dans la rubrique **C2 (green)** sélectionner le canal **C=1**
- Dans la rubrique **C3 (Blue)** sélectionner le canal **C=2**
- Cocher **Create Composite** et cliquer sur **OK**
- Une image avec les trois canaux apparaît avec une barre de défilement en bas de l'image qui permet de passer d'un canal à un autre.
- Sur la barre Image J, Cliquer sur **Image → Adjust → Brightness and Contrast**
- Ajuster la lumière et le contraste pour chaque canal de manière à bien mettre en évidence les lignes de marquages bleu (calcéine) et orange (alizarine)
- Sur la barre Image J, sélectionner l'icône polygonale (si vous mettez le curseur dessus sans cliquer il vous affichera « Polygon Selections »).
- Zoomer sur l'image en utilisant la touche Ctrl et le curseur de la souris. Le zoom se fait sur l'endroit où la souris est placée sur l'image.
- Avec le bouton gauche de la souris, dessiner l'aire entre deux lignes de marquages par des clics successifs en passant par le milieu de l'épaisseur de chaque marquage.
- La sélection peut être refermée en recliquant sur le premier point réalisé ou en utilisant le bouton droit de la souris.
- Cliquer sur « M » sur le clavier, le résultat en aire en μm^2 s'affiche.
- Cliquer à l'extérieur de la sélection et réitérer la mesure pour chaque aire présente entre les marquages d'intérêts.

E. Sélection et isolement d'une région d'intérêt du réseau lacuno-canaliculaire avec ImageJ

Important : Le format .czi est déjà calibré pour ImageJ, les mesures donneront les résultats à la bonne échelle, pas besoin de réaliser une calibration.

- Ouvrir Image J
- Faites glisser le stack63X.czi dans la barre (Fiji Is Just) Image J, une fenêtre Bio-Formats Import Options s'ouvre automatiquement
- Sélectionner **Split Channel** et cliquer **OK**. Trois fenêtres vont s'ouvrir : C=0 pour la calcéine, C=1 pour la fluorescéine et C=2 pour l'alizarine.
- Sélectionner la fenêtre de la calcéine, sur la barre Image J, Cliquer sur **Image → Adjust → Brightness and Contrast** de manière à mettre en évidence les lignes de marquages
- Faire de même avec la fenêtre de l'alizarine
- Faire de même avec la fenêtre de la fluorescéine de manière à rendre les lacunes visibles.
- Garder la sélection sur la fenêtre de la fluorescéine, cliquer sur **Process → Math → Gamma**. Sélectionner une valeur de 0,7 et cliquer sur **OK**
- Sur la barre Image J, cliquer sur **Image → Color → Merge Channel**. Une fenêtre Merge Channels s'ouvre
- Dans la rubrique **C1 (red)** sélectionner le canal **C=2**
- Dans la rubrique **C2 (green)** sélectionner le canal **C=1**
- Dans la rubrique **C3 (Blue)** sélectionner le canal **C=0**
- Décocher **Create Composite** et cliquer sur **OK**, une fenêtre combinant les 3 canaux s'ouvre. Une barre de défilement en bas de la fenêtre permet de passer d'une coupe à une autre (déplacement en Z)
- Sur la barre Image J, cliquer sur **Image → Stacks → Stack to images**, plusieurs fenêtres apparaissent correspondant chacune à une position en Z de l'image combinant les 3 canaux. Chaque fenêtre est nommée RGB-nnnn (avec « nnnn » le numéro (position de la coupe).
- Sélectionner une des images d'intérêt. Sur la barre Image J, sélectionner l'icône polygonale (si vous mettez le curseur dessus sans cliquer il vous affichera « Polygon Selections »).
- Zoomer sur l'image en utilisant la touche Ctrl et le curseur de la souris. Le zoom se fait sur l'endroit où la souris est placée sur l'image.
- Avec le bouton gauche de la souris, dessiner l'aire entre deux lignes de marquages délimitant le réseau d'intérêt par des clics successifs.

- La sélection peut être refermée en recliquant sur le premier point réalisé ou en utilisant le bouton droit de la souris.
- Cliquer sur « M » sur le clavier, le résultat en aire en μm^2 s'affiche.
- Pour isoler la zone sélectionnée, sur la barre Image J cliquer sur **Edit → Clear Outside** puis **Image → Crop** (ou Ctrl+Maj+X).
- Sur la barre Image J cliquer sur **Image → Color → Split Channels**, 3 fenêtre en noir et blanc apparaissent : RGB-nnnn (red) pour le canal de l'alizarine, RGB-nnnn (blue) pour le canal de la calcéine et RGB-nnnn (green) pour le canal de la fluorescéine.
- Supprimer les canaux de l'alizarine et de la calcéine.
- Sélectionner le canal de la fluorescéine, sur la barre Image J cliquer sur **Image → Lookup Tables → Green**.
- Sur la barre Image J, cliquer sur **File → Save As → Tiff...,** donner un nom à l'image, par exemple F1.
- Supprimer la fenêtre bleu
- Sélectionner la fenêtre DiI, Image, look up tables, red.
- Sélectionner la fenêtre Fluo, Image, look up tables, green.

F. Segmentation du réseau lacuno-canaliculaire avec ImageJ

- Ouvrir Image J
- Glisser le réseau.Tiff dans la barre (Fiji Is Just) Image J
- Sur la barre Image J, cliquer sur **Plugins → Segmentation → Trainable Weka Segmentation**, une fenêtre Trainable Weka Segmentation s'ouvre
- Cliquer sur **Settings**, une fenêtre Segmentation settings s'ouvre
- Dans la rubrique « Class names » écrire le nom des catégories à segmenter (par exemple pour Classv1 Lacunes, pour Class 2 : Canalicules), cliquer sur **OK**
- Cliquer sur « Create new class » pour rajouter une catégorie (par exemple pour le fond)
- Choisissez un des outils de dessin de la barre ImageJ et dessiner un canalicule sur l'image puis cliquer sur « Add to Canalicules » sur le côté droit de la fenêtre
- Faire pareil avec les autres catégories
- Cliquer sur « Train Classifier », attendre que le logiciel intègre la segmentation (les icônes seront grisés pendant ce temps) puis cliquer sur « Create Results » qui va donner le résultat de la segmentation.
- Si celle-ci n'est pas satisfaisantes, redessiner des structures sur l'image et les rajouter pour améliorer l'apprentissage pour être le plus fidèle possible à l'image d'origine.
- Une fois la qualité souhaitée atteinte, cliquer sur « Save Classifier » et sauvegarder le modèle de segmentation.
- Cliquer sur « Get probability » pour obtenir les images segmentées qui peuvent être analysées et les sauvegarder en les sélectionnant puis en cliquant sur la barre ImageJ sur **File → Save As → Tiff…**

Une Macro a été réalisée par Peurière et. al. au laboratoire pour automatiser la segmentation. La macro qui est présentée ci-dessous reprend le même principe avec quelques ajustements lié au protocole expérimental utilisé pendant cette thèse.

Macro de segmentation ImageJ

```
n=1;
while(n<=6)
 {
 x=1;
 while(x<=6)
  {
open("D:/Mathieu/WBV3/Confocal/Réseau après S2/2) Stack et ROI choisis/8) DKO VB/DKO VB "+n+"/F"+x+".tif");
wait(2000);
run("Trainable Weka Segmentation");
```

```
		wait(2000);
		selectWindow("Trainable Weka Segmentation v3.2.34");
		wait(2000);
		call("trainableSegmentation.Weka_Segmentation.loadClassifier",
		"D:/Mathieu/WBV3/Confocal/Réseau après S2/Modèle de
		segmentation/classifierFLUO17.model");
		wait(2000);
		call("trainableSegmentation.Weka_Segmentation.getResult");
		wait(2000);
		selectWindow("Classified image");
		name="F"+x;
		saveAs("Tiff", "D:/Mathieu/WBV3/Confocal/Réseau après S2/3) Image Sequence/8) DKO
		VB/DKO VB "+n+"/"+name+".tif");
		wait(2000);
		close();
		call("trainableSegmentation.Weka_Segmentation.getProbability");
		wait(2000);
		selectWindow("Probability maps");
		saveAs("Tiff", "D:/Mathieu/WBV3/Confocal/Réseau après S2/4) Probability map/8) DKO
		VB/DKO VB "+n+"/"+name+".tif");
		wait(2000);
		close();
		selectWindow("Trainable Weka Segmentation v3.2.34");
		close();
		close();

			x=x+1;
		}
		n=n+1;
}
```

G. Analyse du réseau lacuno-canaliculaire avec ImageJ

- Ouvrir Image J
- Glisser la probability map.Tiff dans la barre (Fiji Is Just) Image J
- Sur la barre Image J, cliquer sur **Image → Stacks → Stack to Images**, les 3 catégories segmentées apparaissent sur 3 fenêtre différentes.
- Supprimer la ou les fenêtres des catégories qui ne seront pas utilisées (par exemple le fond)
- Sélectionner la fenêtre des lacunes, sur la barre Image J cliquer sur **Process → Binary → Make Binary**
- Sur la barre Image J, cliquer sur **Analyze → Set Measurements**, une fenêtre « Set Measurements » s'ouvre, cocher les paramètres souhaité pour l'analyse (par exemple Area, shape descriptors, Area fraction) et cliquer sur **OK**
- Sur la barre Image J, cliquer sur **Analyze → Analyze Particles**, une fenêtre « Analyze Particles s'ouvre », sélectionner les options de mesures souhaitées (par exemple taille des lacunes à minimum 15µm^2, la circularité allant de 0 à 1, la schématisation des lacunes) et cliquer sur **OK**
- Trois fenêtres s'ouvrent : « Results », « Summary » et « Drawing of Lacunae » qui est la schématisation des lacunes. Sauvegarder ces fenêtres en allant sur la barre Image J et cliquer **File → Save As → Tiff…**
- Fermer la fenêtre de la catégorie lacunes.
- Sélectionner la fenêtre de la catégorie canalicules, sur la barre Image J cliquer sur **Process → Binary → Make Binary**
- Sur la barre Image J, cliquer sur **Analyze → Set Measurements**, une fenêtre « Set Measurements » s'ouvre, cocher les paramètres souhaité pour l'analyse (par exemple Area et Area fraction) et cliquer sur **OK**
- Sur la barre Image J, cliquer sur **Analyze → Measure**, une fenêtre « Results » s'ouvre et donne les résultats sur l'aire du réseau lacunaire. Sauvegarder ces résultats en allant sur la barre Image J et cliquer **File → Save As → Tiff…**
- Sélectionner la fenêtre des canalicules (qui est maintenant binarisée) et sur la barre Image J, cliquer sur **Process → Binary → Skeletonize**
- Sur la barre Image J, cliquer sur **Analyze → Skeleton → Analyze Skeleton (2D/3D)**, une fenêtre « Analyze Skeleton » s'ouvre, cliquer sur **OK**
- Trois fenêtres s'ouvrent : « Results », « Branch information » et « Tagged skeleton »
- La fenêtre « Results » donne le nombre de branches et de jonctions. Pour avoir le nombre total de ces deux paramètres il faut les copier-coller dans un tableaur (par exemple Excel) ou utiliser le code Macro d'ImageJ suivant pour donner la somme dans la fenêtre Log :

```
name = "Stack " + x;
suma = 0;
sumb = 0;

selectWindow("Results");
lines1 = split(getInfo(), "\n");
headings = split(lines1[0], "\t");
for (j=1; j<lines1.length; j++) {
      values = split(lines1[j], "\t");
      a = values[0];
      b = values[1];
      suma = suma + a;
      sumb = sumb + b;
}
print (name);
namea= "Sum nb branches "+ suma;
nameb= "sum nb junctions "+ sumb;
print (namea);
print (nameb);
```

- La fenêtre « Branch information » donne la longueur individuelle de chaque branche dans la deuxième colonne. Pour avoir le nombre total pour ce paramètre, il faut copier-coller la colonne dans un tableaur (par exemple Excel) ou utiliser le code Macro d'ImageJ suivant pour donner la somme dans la fenêtre Log :

```
sumc = 0;
 selectWindow("Branch information");
lines1 = split(getInfo(), "\n");
headings = split(lines1[0], "\t");
for (j=1; j<lines1.length; j++) {
      values = split(lines1[j], "\t");
      c = values [1];
      sumc=sumc + c;
}
namec="Sum branch length "+sumc;
print (namec);
```

- La fenêtre « Tagged skeleton » illustre la répartition des pixels de l'image en 3 sous-catégories :

    - Les « slabs pixels » qui sont colorés en orange et qui possèdent 2 pixels voisins

- Les « junction pixels » qui sont colorés en violet et qui possèdent plus de 2 pixels voisins
- Les « end-point pixels » qui sont colorés en bleu et qui possèdent 0 ou 1 pixel voisin

- Sauvegarder chacune de ces fenêtres en les sélectionnant puis sur la barre Image I en cliquant sur **File → Save As → Tiff…**

Une Macro a été réalisée par Peurière et. al. au laboratoire pour automatiser l'analyse. La macro qui est présentée ci-dessous reprend le même principe avec quelques ajustements lié au protocole expérimental utilisé pendant cette thèse.

Macro d'analyse Image J

```
n=1;
while(n<=6)
 {
 x=1;
 while(x<=6)
{
open("D:/Mathieu/WBV3/Confocal/Réseau après S2/4) Probability map/7) DKO CT/DKO CT "+n+"/F"+x+".tif");
run("Stack to Images");
close("Backround");
selectWindow("Lacunae");
run("Make Binary");
wait(2000);
selectWindow("Lacunae");
run("Erode");
wait(1000);
run("Dilate");
wait(2000);
selectWindow("Lacunae");
```

```
run("Set Measurements...", "area fit shape area_fraction limit display redirect=None decimal=3");

run("Analyze Particles...", "size=15-Infinity show=Outlines display exclude clear include summarize");

wait(1000);

close("Lacunae");

wait(5000);

selectWindow("Drawing of Lacunae");

saveAs("Tiff", "D:/Mathieu/WBV3/Confocal/Réseau après S2/5) Results Lacunae/Fluo/7) DKO CT/DKO CT "+n+"/D"+x+".tif");

close();

wait(1000);

selectWindow("Results");

saveAs("Text", "D:/Mathieu/WBV3/Confocal/Réseau après S2/5) Results Lacunae/Fluo/7) DKO CT/DKO CT "+n+"/R"+x+".txt");

close("Results");

wait(1000);

selectWindow("Summary");

wait(1000);

saveAs("Text", "D:/Mathieu/WBV3/Confocal/Réseau après S2/5) Results Lacunae/Fluo/7) DKO CT/DKO CT "+n+"/S"+x+".txt");

wait(2000);

close("Summary");

wait(2000);

selectWindow("Canaliculi");

        setOption("BlackBackground", false);

run("Make Binary");

wait(1000);

run("Measure");

wait(1000);

selectWindow("Results");

wait(1000);

saveAs("Text", "D:/Mathieu/WBV3/Confocal/Réseau après S2/6) Results Canaliculi/Fluo/7) DKO CT/DKO CT "+n+"/Cn.Ar."+x+".txt");
```

```
wait(1000);
close("Results");
wait(1000);
selectWindow("Canaliculi");
wait(1000);
run("Skeletonize");
wait(1000);
run("Analyze Skeleton (2D/3D)", "prune=none show");
wait(1000);
close("Canaliculi");
wait(1000);
name = "Stack " + x;
suma = 0;
sumb = 0;
selectWindow("Results");
lines1 = split(getInfo(), "\n");
headings = split(lines1[0], "\t");
for (j=1; j<lines1.length; j++) {
        values = split(lines1[j], "\t");
        a = values[0];
        b = values[1];
        suma = suma + a;
        sumb = sumb + b;
}
print (name);
namea= "Sum nb branches "+ suma;
nameb= "sum nb junctions "+ sumb;
print (namea);
print (nameb);
sumc = 0;
 selectWindow("Branch information");
```

```
lines1 = split(getInfo(), "\n");
headings = split(lines1[0], "\t");
for (j=1; j<lines1.length; j++) {
	values = split(lines1[j], "\t");
	c = values [1];
	sumc=sumc + c;
}
namec="Sum branch length "+sumc;
print (namec);
wait(1000);
selectWindow("Tagged skeleton");
wait(1000);
saveAs("Tiff", "D:/Mathieu/WBV3/Confocal/Réseau après S2/6) Results Canaliculi/Fluo/7) DKO CT/DKO CT "+n+"/Skelt."+x+".tif");
wait(1000);
close();
wait(1000);
selectWindow("Log");
wait(1000);
saveAs("Text", "D:/Mathieu/WBV3/Confocal/Réseau après S2/6) Results Canaliculi/Fluo/7) DKO CT/DKO CT "+n+"/Data.Cn."+x+".txt");
wait(1000);
close("Log");
wait(1000);
close("Results");
wait(1000);
close("Branch information");
wait(2000);
x=x+1;
 }
n=n+1;
 }
```

VI) Annexes communication

Communication orale aux 21ème Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisées ; Boulogne-sur-mer, 5 au 7 juin 2019

IMPACT DE L'EXTINCTION GENIQUE DE LA SIALOPROTEINE OSSEUSE ET/OU L'OSTEOPONTINE SUR LA REPONSE DU SQUELETTE A LA VIBRATION CORPS ENTIER.

MAALOUF Mathieu, CINAR Hawa, VANDEN-BOSSCHE Arnaud, LAROCHE Norbert, THOMAS Mireille, RENAUDIN Mélina, GUIGNANDON Alain, LAFAGE-PROUST Marie-Hélène, VICO Laurence, MALAVAL Luc.

INSERM, U1059, SAINBIOSE, Faculté de Médecine, Université Jean Monnet - Université de Lyon, Saint-Etienne, France.

La sialoprotéine osseuse (BSP) et l'ostéopontine (OPN) sont deux protéines SIBLING (Small Integrin Binding LIgand N-linked Glycoprotein) co-exprimées par les cellules osseuses. Ces deux protéines jouent un rôle clé dans le remodelage du tissu squelettique et dans son adaptation aux contraintes mécaniques. En particulier, leurs gènes présentent une réponse rapide aux contraintes mécaniques exercées sur le squelette. Nous avons récemment développé et décrit des modèles murins d'extinction génique ($^{-/-}$, KO) individuelle ou conjointe de BSP et OPN, sur un fond 129_{sv}/CD1 (Bouleftour et al., Bone, 120:411, 2019). Pour évaluer les réponses de ces mutants à un stimulus mécanique intermittent validé sur un autre fond génique (Gnuybkin et al., J Biomech, 49:1899, 2016), des souris mâles de 14 semaines, de 4 génotypes (sauvage=WT, $BSP^{-/-}$, $OPN^{-/-}$ et double KO=DKO) ont été soumises à un régime de vibration corps entier à 90Hz sous 2g d'accélération, 15 minutes/jour, 5 jours/semaine durant 6 semaines. En fin de protocole, fémurs et vertèbres ont été collectés pour micro-tomographie et histomorphométrie, et les tibias pour qRT-PCR.

Les courbes de prise de poids des souris des quatre génotypes n'ont pas été modifiées par la vibration. Le régime vibratoire a eu peu d'impact sur l'os trabéculaire des WT et mutants, à l'exception des $OPN^{-/-}$ qui montrent une chute du volume trabéculaire de l'os vertébral (L2, BV/TV: -18%, $p<0.05$, N=10, U de Wilcoxon-Mann-Whitney) avec réduction du nombre et de l'épaisseur des trabécules. De manière intéressante, cette perte osseuse s'accompagne d'une augmentation des surfaces marquées par la Tétracycline (TTC) et du nombre de cellules $TRAcP^{+}$, témoins d'un remodelage accéléré.

L'os cortical des souris vibrées montre une réduction de la porosité des WT et DKO, et une augmentation significative de l'épaisseur corticale des $BSP^{-/-}$ (+4%, $p<0.05$, N=10). L'analyse en qRT-PCR de l'os cortical des tibias en fin d'expérience a montré chez les $BSP^{-/-}$ une réduction de l'expression de RANK-L, de Cathepsine K et d'OPN, suggérant une chute de l'activité de résorption. Une étude préliminaire des surfaces marquées par la TTC ne montre aucun effet de la vibration sur les $BSP^{-/-}$, DKO et WT mais une augmentation des surfaces minéralisantes dans l'endoste (+34%, $p<0.05$, N=4) et le périoste (+14%, NS, N=4) des $OPN^{-/-}$.

En conclusion, les souris $BSP^{-/-}$, $OPN^{-/-}$ et DKO montrent des effets distincts et spécifiques de site d'un signal vibratoire, témoignant de l'importance de ces facteurs pour la réponse osseuse aux contraintes mécaniques. L'analyse se poursuit pour confirmer une régulation par l'OPN de l'intensité de l'activité osseuse induite par les signaux mécaniques intermittents, et ses interactions avec la BSP dans ce contexte.

Communication orale aux European Calcified Tissue Society 2021 ; 6-8 mai 2021 et obtention du prix New Investigator Award

Knockout of Osteopontin or Bone sialoprotein induce opposite response to mechanical stimulation

Mathieu MAALOUF, Hawa CINAR, Arnaurd VANDEN-BOSSCHE, Mireille THOMAS, Norbert LAROCHE, Alain GUIGNANDON, Luc MALAVAL.

Bone sialoprotein (BSP) and osteopontin (OPN) are co-expressed by bone cells and display rapid gene response to mechanical signals. To clarify their roles in this process, 2 months old male wild type, OPN knockout ($OPN^{-/-}$), $BSP^{-/-}$ and OPN/BSP double knockout (DKO) mice were distributed in control (CT) and vibrated (VB) groups (n=10/group). Mice stayed on a vibrating plate (2g/45Hz) for 15 min/day during 6 weeks (plate kept still for CT). Bones were collected for micro-tomography, histomorphometry, RT-qPCR (CEEAL-UJM, agreement Nr°98).

Vibration reduced trabecular volume in $OPN^{-/-}$ mice (vertebra BV/TV: -18%, $p<0.05$) with increased osteoclast surfaces (Oc.S/BS: +72%, $p<0.01$). $OPN^{-/-}$ lost femoral cortical bone (Ct.Th: -9%, $p<0.01$) under increased resorption (Ec.Oc.S/B.S: +95%, $p<0.05$). Strikingly, VB $BSP^{-/-}$ mice gained cortical bone (Ct.Th: +7%, $p<0.01$), with significant increase in formation, less osteoclasts (Ps.Oc.S/B.S: -68%, $p<0.05$) and lower RANKL and CathK expression. Sequential fluorochrome labeling (Figure 1) documented increased formation in VB $BSP^{-/-}$ cortex (Figure 2). No effect was observed in other genotypes.

BSP and OPN thus play crucial and opposite roles in bone response to mechanical stimulation. As $BSP^{-/-}$ mice overexpress OPN, and DKO mice showed no response, interaction between these two factors seems required for a proper skeletal response to mechanical challenges.

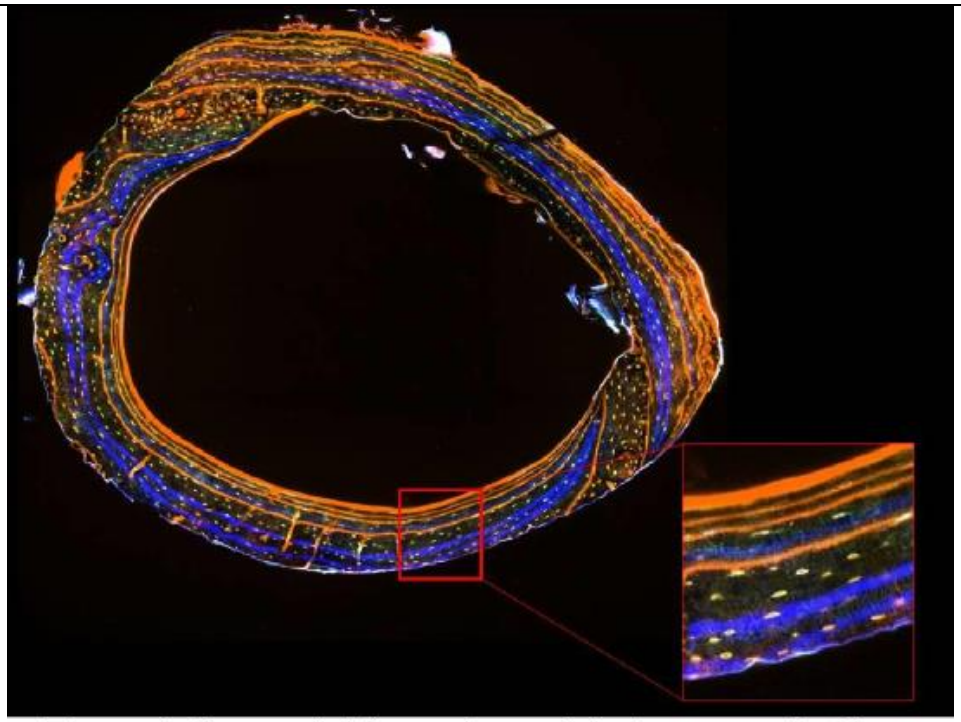


Figure 1: Sequential fluorochrome labeling on cortical bone using alizarin complexone (orange) and calcein blue (blue). VB BSP$^{-/-}$ mouse.

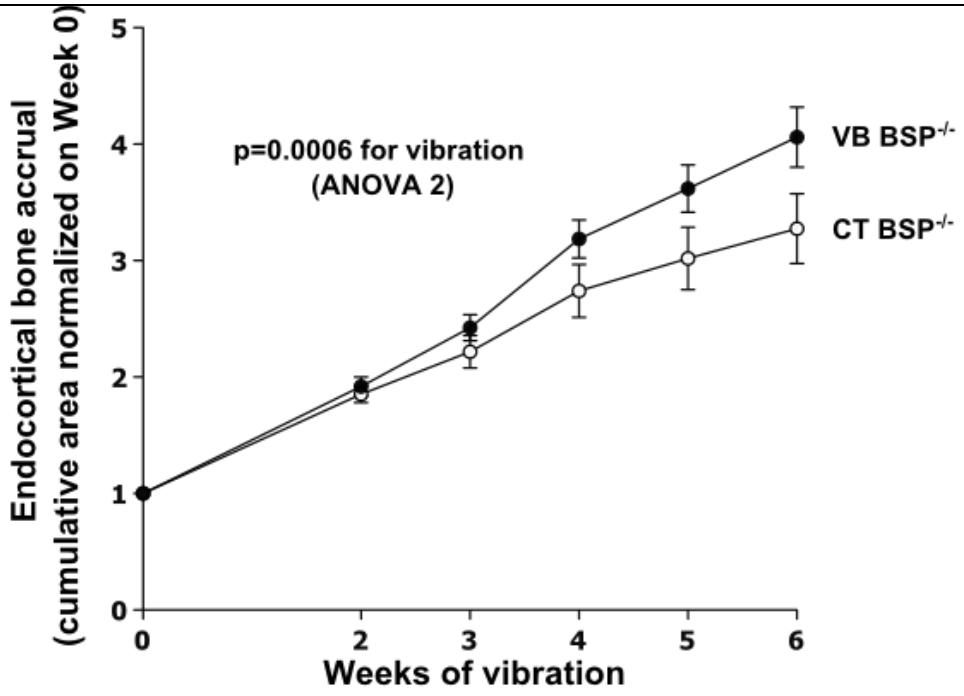


Figure 2: Endocortical bone accrual in CT (empty circles) and VB (black circles) BSP$^{-/-}$ mice. Values are mean ± SEM of 6 mice.


ECTS CONGRESS
#ECTS2021
ECTS 2021
DIGITAL
06-08 MAY LIVE PRIME TIME
MAY-JUNE 2021 ECTS@HOME
ECTS
European Calcified Tissue Society
THIS IS TO CERTIFY THAT
Mathieu Maalouf
HAS BEEN AWARDED THE
2021 ECTS -Bone Reports New Investigator Award
IN RECOGNITION
OF OUTSTANDING WORK WHICH HAS BEEN ACCEPTED FOR PRESENTATION
DURING THE 48th ANNUAL CONGRESS OF THE ECTS
6-8 May 2021, DIGITAL CONGRESS, LIVE PRIME TIME
Bo Abrahamsen
ECTS PRESIDENT
Barbara Obermayer-Pietsch
ECTS RESEARCH COMMITTEE CHAIR
Supported By
ELSEVIER

Communication orale à l'International Society of Gravitational Physiology; 24-27 mai

Hypergravity and whole body vibration affect distinct compartments of mouse bones, with opposite effects in Osteopontin or Bone Sialoprotein knock-outs

Mathieu Maalouf[1], Hawa Cinar[1], Wafa Bouleftour-Esquis[2], Arnaud Vanden-Boscche[1], Mireille Thomas[1], Norbert Laroche[1], Laurence Vico[1], Marie-Hélène lafage-Proust[1], Alain Guignandon[1] and Luc Malaval[1].
[1]INSERM - Université Jean Monnet, U1059-Sainbiose-LBTO, St Priest en Jarez, France.
[2]Université Jean Monnet - Département Universitaire de la Recherche et de l'Enseignement, Institut de Cancérologie Lucien Neuwirth, Saint-Etienne, France.

INSERM U1059 – Université Jean Monnet Saint-Etienne

Osteopontin (OPN) and Bone Sialoprotein (BSP) are two SIBLING (Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoproteins) proteins co-expressed by bone cells and involved in bone remodeling and mineralization. Their genes show a rapid response to mechanical stimuli (Mitsui *et al*., Life Sciences, 77:3168, 2005) suggesting a key role in bone adaptation to stress. We have generated and/or described single gene knock-out (KO, -/-) mouse models of BSP, OPN and BSP+OPN double KO (DKO, Bouleftour *et al*., Bone, 120:411, 2019). To determine their respective response to mechanical stress, we tested these mouse lines in two models: 2g hypergravity (HG) and whole body vibration (WBV).

In HG experiments, 2 months old wild-type (WT), BSP^{-/-}, OPN^{-/-}, and DKO mice (n=10/group) were centrifuged at 2g for 3 weeks. Control mice were kept at 1g. For WBV, 2 months old male mice of the 4 genotypes (n=10/group) were vibrated at 2g/90Hz, 15 min/day, 5 day/week for 6 weeks. Control mice were placed for the same duration on resting vibration plates. In all experiments, mice received two injections of tetracycline to label bone formation surfaces. At the end of the protocols, femurs and vertebras were collected for micro-tomography and histomorphometry, and the tibias for RT-qPCR.

HG mostly impacted trabecular bone (no morphometric change in cortical bone of either genotype). Bone Volume (BV/TV) was increased in 2g WT mice (+20%, $p<0.05$, Mann-Whitney U test) with a decrease in Osteoclast Surface (Oc.S/BS: -21%, $p<0.05$), and in 2g BSP^{-/-} mice (+27%, $p<0.05$) with increased Bone Formation Rate (BFR/BS: +41%, $p<0.05$). In contrast, HG decreased trabecular BV/TV in OPN^{-/-} mice (-21%, $p<0.05$) with increased bone activity (BFR/BS: +107%, $p<0.05$; Oc.S/BS: +51%, $p<0.01$). Remarkably, HG did not affect bone volume nor cellular activity in the trabecular bone of DKO mice.

WBV treatment mainly impacted cortical bone (with reduced trabecular BV/TV only in OPN^{-/-} vertebras). WBV increased cortical thickness (Ct.Th) of BSP^{-/-} mice (+7%, $p<0.01$) with higher endocortical BFR/BS (+40%, $p<0.01$) and reduced periosteal Oc.S/BS (-68%, $p<0.05$). Gene expression analyses of cortical bone showed that under WBV, expression of resorption markers RANKL and Cathk dropped in BSP^{-/-} mice. Strikingly, WBV reduced the Ct.Th of OPN^{-/-} mice (-9%, $p<0.01$), by decreasing the BFR/BS (-54%, $p<0.01$) and increasing the Oc.S/BS (+95%, $p<0.05$) on the endocortical surface. WBV did not alter cortical bone in WT and DKO mice.

In conclusion, HG mainly targets trabecular bone and WBV mainly cortical bone. In both regimes, the absence of BSP, which leads to an increase in OPN expression (Neves-Granito *et al.*, J Cell Physiol, 230:1342, 2015) is associated with a gain in bone mass, whereas the absence of OPN is associated with loss. However, the insensitivity of DKO mice to both regimes indicates that co-expression of BSP and OPN is required for optimal regulation of the skeletal response to mechanical challenges.

Communication affichée à la journée de la recherche de l'école doctorale ; 10 juin 2021

L'ostéopontine et la sialoprotéine osseuse possèdent des rôles opposés dans la réponse du squelette aux contraintes mécaniques

Mathieu MAALOUF[1], Hawa CINAR[1], Wafa BOULEFTOUR-ESQUIS[2], Laura PEURIERE1, Arnaud VANDEN-BOSCCHE[1], Mireille THOMAS[1], Norbert LAROCHE[1], Marie-Hélène LAFAGE-PROUST[1], Laurence VICO[1], Alain GUIGNANDON[1] et Luc MALAVAL[1].

1) INSERM – Université Jean Monnet, U1059-SAINBIOSE-LBTO, Saint-Priest-En-Jarez, France.

2) Université Jean Monnet – Département Universitaire de la Recherche et de l'Enseignement, Institut de Cancérologie Lucien Neuwirth, Saint-Etienne, France.

INTRODUCTION

L'ostéopontine (**OPN**) et la sialoprotéine osseuse (**BSP**) sont deux **protéines** exprimées par les cellules osseuses. Elles jouent un rôle dans la régulation de la minéralisation et du remodelage osseux, c'est-à-dire **la résorption et la formation** indispensables au renouvellement de l'os.

Dans notre laboratoire, nous avons développé des souris qui n'expriment pas l'OPN (**OPN$^{-/-}$**) et d'autres qui n'expriment pas la BSP (**BSP$^{-/-}$**) afin de voir l'effet de leur absence sur le squelette. Les souris BSP$^{-/-}$ présentent une surexpression d'OPN ce qui nous a conduit à générer des souris qui n'expriment ni l'OPN ni la BSP, ce sont les **DKO** (pour *Double Knock-out*).

Des études ont démontré que lors d'une **stimulation mécanique** l'os produit de manière rapide de l'OPN et de la BSP. De ce fait, deux questions seront traitées dans notre étude: comment l'os réagit chez les souris n'exprimant pas l'OPN ou la BSP ou les deux ? Et comme les souris BSP$^{-/-}$ possèdent un taux élevé d'OPN, existe-t-il des interactions entre BSP et OPN dans l'os lors de la contrainte mécanique ?

MATERIELS & METHODES

Afin de clarifier le rôle de l'OPN et de la BSP dans l'adaptation de l'os aux contraintes mécaniques, nous avons soumis des souris WT (pour *Wild-Type*, souris sauvage), BSP$^{-/-}$, OPN$^{-/-}$ et DKO à un **régime vibratoire** (figure 1). Ce dernier consiste à faire vibrer les souris à 2g/90Hz pendant 15 minutes/jour durant 6 semaines. Au cours du régime vibratoire, nous avons injecté des produits fluorochromes qui marquent le bord de l'os afin de suivre la **quantité d'os formée** chaque semaine de vibration et d'en déduire la **vitesse de formation osseuse**. En fin d'expérimentation, les os longs ont été prélevés pour effectuer des analyses de micro-tomographie (scanner des os), d'histomorphométrie (activités cellulaires de formation et de résorption) et de qRT-PCR (expression des gènes dans l'os).

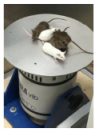


Figure 1: Souris posées sur une plateforme de vibration

RESULTATS & DISCUSSION

La vibration diminue l'épaisseur de l'os cortical des souris OPN$^{-/-}$ et l'augmente chez les souris BSP$^{-/-}$

Les analyses micro-tomographiques (figure 2) ont montré que, sous vibration, les souris OPN$^{-/-}$ perdent de l'os alors que les souris BSP$^{-/-}$ gagnent de l'os. De manière intéressante le régime vibratoire n'a pas affecté l'os des souris WT et DKO.

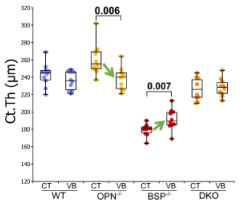


Figure 2: Epaisseur corticale des souris WT, OPN$^{-/-}$, BSP$^{-/-}$ et DKO contrôles (CT) et vibrées (VB). Le seuil α est 0,05. Test U de Wilcoxon Mann-Whitney.

La vibration augmente l'activité de résorption chez les souris OPN$^{-/-}$ et la diminue chez les souris BSP$^{-/-}$

Les analyses histomorphométriques (figure 3 A et B) ont montré que sous vibration les souris OPN$^{-/-}$ augmentent les surfaces de résorption en endoste (partie interne de l'os) alors que les souris BSP$^{-/-}$ diminuent les surfaces de résorption en périoste (partie externe de l'os). De plus les analyses par RT-qPCR (figure 3 C) montrent que les souris BSP$^{-/-}$ diminuent l'expression de RANKL qui est l'un des principaux marqueurs de résorption dans l'os.

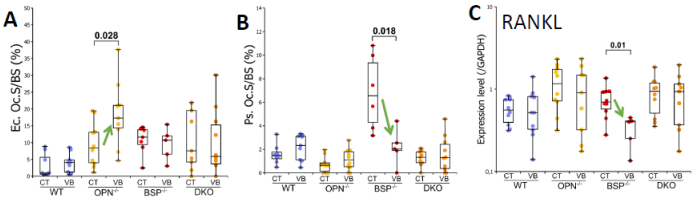


Figure 3: Analyses des données de résorption. Histomorphométrie de la résorption en endoste (A) et en périoste (B) et expression génique du marqueur de résorption RANKL (C). Le seuil α est 0,05. Test U de Wilcoxon Mann-Whitney.

La vibration diminue l'activité de formation des souris OPN$^{-/-}$ et l'augmente chez les souris BSP$^{-/-}$

L'analyse de la dynamique de formation (figure 4 A et B) a montré qu'après 2 semaines de vibration les souris OPN$^{-/-}$ diminuent la vitesse de formation (figure 4 C) tandis que les souris BSP$^{-/-}$ l'augmentent (figure 4 D).

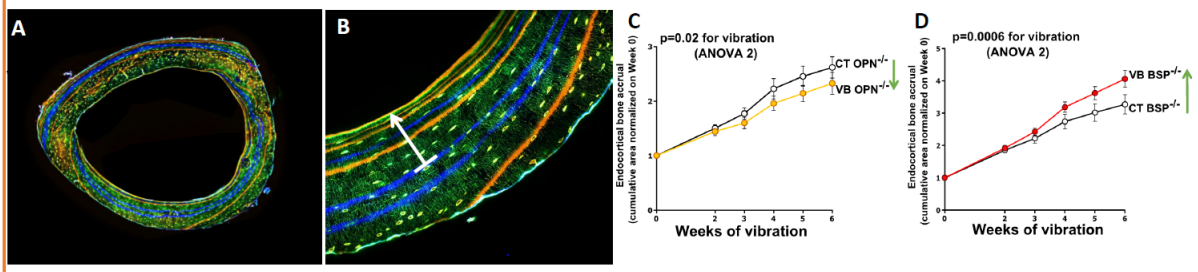


Figure 4: Dynamique de formation osseuse obtenue par injections de fluorochromes. Vue d'ensemble d'une coupe d'os avec les différents marquages (A) et grossissement sur une région d'intérêt (B) où la flèche blanche couvre la période de vibration. Résultats de la dynamique chez les souris OPN$^{-/-}$ (C) et BSP$^{-/-}$ (D) en condition contrôle (CT) et vibrée (VB). Le seuil α est 0,05. Test ANOVA2.

CONCLUSION

Sous vibration, les souris OPN$^{-/-}$ perdent de l'os par une augmentation de la résorption et une diminution de la formation tandis que les souris BSP$^{-/-}$ gagnent de l'os par diminution de la résorption et augmentation de la formation. De ce fait, l'OPN et la BSP possèdent des rôles cruciaux et opposés dans la réponse du squelette à la contrainte mécanique. Comme les souris BSP$^{-/-}$ surexpriment l'OPN, et les souris DKO, comme les souris WT, ne montrent aucune réponse à la vibration, l'interaction entre OPN et BSP semble requise pour l'adaptation du squelette aux contraintes mécaniques.

Abstract présenté pour l'American Society of Bone and Mineral Research 2021 qui aura lieu du 1 au 4 octobre 2021

Mechanical Stimulation Exerts Opposite Effects on Osteopontin- or Bone Sialoprotein-knockout Cortical Bone Accrual, with Correlative Changes in Osteocyte Density

Auteurs : Mathieu Maalouf, Hawa Cinar, Laura Peurière, Wafa Bouleftour-Esquis, Arnaud Vanden-Boscche, Mireille Thomas, Marie-Hélène Lafage-Proust, Laurence Vico, Alain Guignandon, Luc Malaval

Osteopontin (OPN) and Bone Sialoprotein (BSP) are two SIBLING (Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoproteins) co-expressed by bone cells and involved in bone remodeling and mineralization. Both genes show rapid expression under mechanical stimulation, suggesting a potential role in mechanical adaptation of bone. To clarify their mutual role and interactions in this process, 8 weeks old male Wild-Type (WT), OPN knockout ($OPN^{-/-}$), BSP knockout ($BSP^{-/-}$) and OPN+BSP double knockout (DKO) mice (n=10/group) were submitted to whole body vibration (WBV, 2g/90Hz, 15 min/day for 6 weeks). Long bones were collected for microtomography, histomorphometry and RT-qPCR.

WBV did not affect femur cortical bone in WT and DKO mice. Vibration reduced the cortical thickness in $OPN^{-/-}$ mice (Ct.Th, -9%, $p<0.01$, Mann-Whitney U test) with significant decrease in bone formation and increase in resorption at the endocortical surface. In contrast, WBV increased the Ct.Th in $BSP^{-/-}$ mice (+7%, $p<0.01$), stimulating endocortical formation and decreasing periosteal resorption as well as RANKL and CathK expression.

A sequential fluorochrome labelling protocol (Figure 1) showed drastic differences in basal endocortical bone dynamics between genotypes, with low bone accrual in $OPN^{-/-}$ mice (-27% vs WT, weeks 7 to 14, $p=7*10^{-5}$, ANOVA) contrasting with higher accrual in $BSP^{-/-}$ (+30%, $p=6*10^{-10}$) and DKO mice (+23%, $p=1*10^{-4}$). WBV decreased bone accrual in $OPN^{-/-}$ mice (-11% vs Controls = CT, $p=0.02$) and increased it in $BSP^{-/-}$ mice (+24%, $p=0.001$), significant only after 2 weeks of vibration. In cortical bone layed after 2 weeks of WBV, $OPN^{-/-}$ mice showed reduced osteocyte lacunar density (-17%, $p<0.05$) and lacunar area (-11%, $p<0.05$), while these parameters increased in vibrated $BSP^{-/-}$ mice (+20% for lacunar density, $p<0.05$, +16% for lacunar area, $p<0.05$). Multiple gene expression analysis targeting mechanotransduction signaling pathways in CT and WBV mice is ongoing.

In conclusion, $OPN^{-/-}$ mice lose cortical bone under WBV, while $BSP^{-/-}$ mice gain bone, with correlative effects on osteoblast and osteoclast activity, and impact on osteocytes lacunar density and shape. OPN and BSP thus play crucial and opposite roles in bone response to mechanical stimulation. Because $BSP^{-/-}$ mice overexpress OPN, and DKO mice, like WT, showed no response to this

challenge, interplay between these two proteins appear to be a key element of skeletal adaptation to mechanical stimulation.

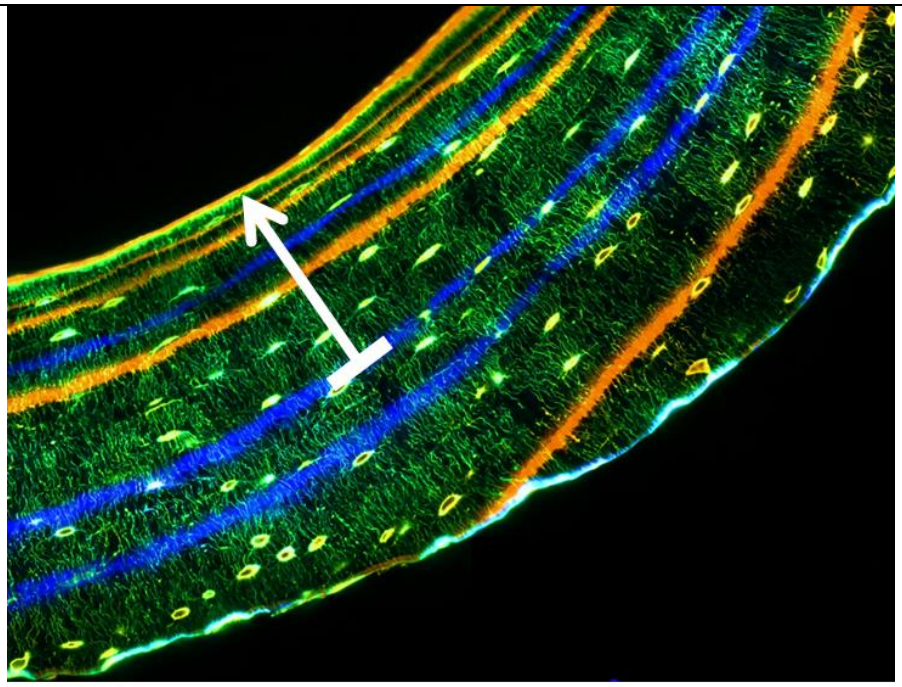


Figure 1: Sequential fluorochrome labelling protocol using alizarin complexon (orange, weeks 5, 10, 12 & 13) and calcein blue (blue, weeks 7, 8 & 11). Lacuno-canalicular network is stained with fluorescein (green). White arrow covers WBV period.

Abstract

Osteopontin (OPN) and bone sialoprotein (BSP) are two SIBLING (Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoproteins) co-expressed by bone cells and involved in remodeling and mineralization regulation. Their genes show a rapid response to mechanical stimuli suggesting a key role in bone adaptation to stress. Our group has generated and/or described gene knockout (-/-, KO) mouse models of BSP, OPN and double KO (DKO, Bouleftour et al., Bone, 120:411, 2019). To better understand the role of OPN and BSP in the mechanical stress response, we tested these lines in two models: hypergravity (HG) and whole body vibration (WBV).

Two-month-old male wild-type (WT), $BSP^{-/-}$, $OPN^{-/-}$ and DKO mice (n=10/group) underwent either a stay at 2g for 3 weeks in a centrifuge, or a 2g/90Hz, 15 min/d vibration regimen for 6 weeks on vibration plates. Femurs and vertebrae were then collected for micro-tomography and histomorphometry, and tibias for RT-qPCR.

HG increases the trabecular bone volume (BV/TV) of WT (+20%, $p<0.05$) and $BSP^{-/-}$ mice (+27%, $p<0.05$) by reducing resorption and increasing formation, respectively. In contrast, HG decreases the trabecular BV/TV of $OPN^{-/-}$ mice (-27%, $p<0.05$) with overall increase in remodeling (BFR/BS: +107%, $p<0.05$; Oc.S/BS: +51%, $p<0.01$) along with increased expression of OCN and TRAcP markers. Remarkably, HG does not affect the trabecular bone of DKO. WBV does not impact trabecular bone, with the exception of $OPN^{-/-}$ mice which show, as in HG, a decrease in BV/TV (-18%, $p<0.05$).

HG has little effect on cortical bone in all 4 genotypes. WBV does not alter cortical bone in WT and DKO but reduces cortical thickness (Ct.Th) in $OPN^{-/-}$ mice (-9%, $p<0.01$) through decreased endocortical formation (Ec. BFR/BS: -54%, $p<0.01$) and increased endocortical resorption (Ec. Oc.S/BS: +95%, $p<0.05$). WBV remarkably increases Ct.Th of $BSP^{-/-}$ (+7%, $p<0.01$) by stimulating endocortical formation (Ec. BFR/BS: +40%, $p<0.01$) and reducing periosteal resorption (Ps. Oc.S/BS: -68%, $p<0.05$) as well as expression of RANKL and CathK markers.

A sequential multi-labeling protocol during the vibratory regime shows that the increase of endocortical formation in $BSP^{-/-}$ mice ($p=0.001$, ANOVA 2) and its decrease in $OPN^{-/-}$ mice ($p=0.02$, ANOVA 2) is detectable after 2 weeks of WBV. Analysis of the lacuno-canalicular network shows that WBV does not impact the density and lacunar area of the network formed during the first two weeks of vibration. Interestingly, in the network formed during the last 4 weeks of WBV, vibration decreases osteocyte lacunar density (-17%, $p<0.05$) and area (-11%, $p<0.05$) in $OPN^{-/-}$ mice whereas it increases these parameters in $BSP^{-/-}$ mice (+20% for density, $p<0.05$, +16% for area, $p<0.05$).

Thus, HG affects mainly trabecular bone and WBV impacts mainly cortical bone. In both regimen, the absence of BSP, which leads to an increase in OPN, is associated with a gain in bone mass, whereas the absence of OPN is associated with bone loss. However, the insensitivity of DKO bones to both regimen indicates that co-expression of BSP and OPN is required for an optimal regulation of skeletal response to mechanical challenges. These results were consolidated by a novel methodological approach that allowed the parallel study of bone dynamics and lacuno-canalicular network architecture in a spatio-temporal perspective.

Key words: Osteopontin, Bone sialoprotein, Whole body vibration, Hypergravity, Lacuno-canalicular network

Résumé

L'ostéopontine (OPN) et la sialoprotéine osseuse (BSP) sont deux SIBLING (Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoproteins) co-exprimées par les cellules osseuses et impliquées dans le remodelage et la régulation de la minéralisation. Leurs gènes présentent une réponse rapide aux stimuli mécaniques suggérant un rôle clé dans l'adaptation de l'os à la contrainte. Notre groupe a généré et/ou décrit des modèles murins d'extinction génique ($^{-/-}$, KO) de la BSP, de l'OPN et double KO (DKO, Bouleftour et al., Bone, 120:411, 2019). Pour mieux comprendre le rôle de l'OPN et de la BSP dans la réponse au stress mécanique, nous les avons testées dans deux modèles : l'hypergravité (HG) et la vibration du corps entier (WBV).

Des souris mâles de 2 mois, sauvages (WT), BSP$^{-/-}$, OPN$^{-/-}$ et DKO (n=10/groupe) ont subi un séjour à 2g pendant 3 semaines en centrifugeuse, ou un régime vibratoire à 2g/90Hz, 15 min/jr pendant 6 semaines sur plateaux vibrants. Fémurs et vertèbres ont ensuite été collectés pour micro-tomographie et histomorphométrie, et les tibias pour RT-qPCR.

L'HG augmente le volume trabéculaire (BV/TV) des WT (+20%, $p<0.05$) et des BSP$^{-/-}$ (+27%, $p<0.05$) par chute de la résorption et augmentation de la formation, respectivement. Au contraire, l'HG diminue le BV/TV trabéculaire des OPN$^{-/-}$ (-27%, $p<0.05$) avec augmentation globale du remodelage (BFR/BS : +107%, $p<0.05$; Oc.S/BS : +51%, $p<0.01$) ainsi que l'expression des marqueurs OCN et TRAcP. Remarquablement, l'HG n'affecte pas l'os trabéculaire des DKO. La WBV n'impacte pas l'os trabéculaire, à l'exception des OPN$^{-/-}$ qui montrent, comme en HG, une baisse du BV/TV (-18%, $p<0.05$).

L'HG a peu d'effet sur l'os cortical des 4 génotypes. La WBV ne modifie pas l'os cortical des WT et des DKO mais réduit l'épaisseur corticale (Ct.Th) des OPN$^{-/-}$ (-9%, $p<0.01$) par chute de la formation endostée (Ec. BFR/BS : -54%, $p<0.01$) et hausse de la résorption endostée (Ec. Oc.S/BS : +95%, $p<0.05$). La WBV augmente remarquablement la Ct.Th des BSP$^{-/-}$ (+7%, $p<0.01$) par stimulation de la formation endostée (Ec. BFR/BS : +40%, $p<0.01$) et chute de la résorption périostée (Ps. Oc.S/BS : -68%, $p<0.05$) ainsi que des marqueurs RANKL et CathK.

Un protocole de multi-marquage séquentiel pendant le régime vibratoire a montré que l'augmentation de la formation endostée des BSP$^{-/-}$ ($p=0.001$, ANOVA 2) et la baisse de celle des OPN$^{-/-}$ ($p=0.02$, ANOVA 2) est détectable après 2 semaines de WBV. L'analyse du réseau lacuno-canaliculaire a montré que la WBV n'a pas impacté la densité et l'aire lacunaire du réseau formé durant les deux premières semaines de vibration. De manière intéressante, dans le réseau formé pendant les 4 dernières semaines de WBV, la vibration diminue la densité (-17%, $p<0,05$) et l'aire lacunaire des ostéocytes (-11%, $p<0,05$) dans les souris OPN$^{-/-}$ alors qu'elle les augmente chez les BSP$^{-/-}$ (+20% pour la densité, $p<0,05$, +16% pour l'aire, $p<0,05$).

L'HG affecte donc essentiellement l'os trabéculaire et la WBV impacte surtout l'os cortical. Dans les deux régimes, l'absence de BSP, qui entraîne une hausse de l'OPN, est associée à un gain de masse osseuse alors que l'absence d'OPN est associée à une perte. Cependant, l'insensibilité des DKO aux deux régimes indique que la co-expression de BSP et OPN est requise pour une régulation optimale de la réponse du squelette aux défis mécaniques. Ces résultats ont été consolidé par une approche méthodologique nouvelle qui permet de coupler de la dynamique osseuse et l'architecture du réseau lacuno-canaliculaire pour les étudier d'un point de vue spatio-temporel.

Mots clés : Ostéopontine, Sialoprotéine osseuse, vibration corps entier, Hypergravité, Réseau lacuno-canaliculaire