

APPEL A PROJET FARMAN 2014

Osteocyte Lacunae: identification des stimuli mécaniques autour des lacunes ostéocytaires par microscopie multi-modale – OLA!

Durée du projet: 2 ans

Responsibles scientifiques:

Elisa Budyn, PU, ENS-Cachan, LMT, elisa.budyn@ens-cachan.fr

Eric Deprez, Dir. CNRS, ENS-Cachan, LBPA, deprez@lbpa.ens-cachan.fr

Membres de l'équipe projet:

Elisa Budyn, LMT	6 homme-mois
Eric Deprez, LBPA	6 homme-mois
Etienne Henry, LBPA	3 homme-mois
Patrick Aimeidieu, LMT	3 homme-mois

Description du problème:

Les tissus biologiques sont caractérisés par une architecture complexe et multi-fonctionnelle. Souvent très hiérarchique, les constructions de la Nature ont des propriétés optimales pour répondre efficacement à une charge mécanique avec un poids minimal. Additionnellement les tissus vivants adaptent leur biologie à des stimuli mécaniques variables. L'os cortical forme la couche extérieure des os longs et est capable de réparation permanente de tous les micro défauts qui naissent ou se propagent dès leur détection. L'os cortical est aussi capable d'apposer du nouveau tissu et de résorber le tissu endommagé. La microstructure de l'os cortical contient des sous-structures tubulaires appelées osteons remodelées par des cellules ayant une activité de résorption appelées ostéoclastes. Ces sous-structures sont ensuite comblées par des lamelles successives de 5 microns d'épaisseur déposées par des cellules formant de l'os appelées ostéoblastes [1]. Certains ostéoblastes restent prisonniers dans ces lamelles nouvellement formées et se différencient en osteocytes. Les osteocytes répondent à des messages biologiques et mécaniques. Ces cellules produisent par exocytose des fibres protéiques formant la matrice extracellulaire dont la structure dépend du micro-environnement naturel *in situ* de la cellule.

La matrice extra cellulaire des lamelles ostéonales osseuses est un tissu minéralisé qui constitue l'environnement des osteocytes. Le milieu est composé d'une phase organique contenant des protéines non-collagéniques comme l'ostéopontine et de protéoglycans comme la décorine qui agissent comme de la glue entre les fibrilles de collagène

(principalement de type I) et la phase minérale des nano-cristaux plats d'hydroxyapatite. La structure hiérarchique de ce composite affecte les propriétés de fissuration de l'os [2]. Dans l'exercice du quotidien, du à sa teneur minérale importante, l'os subit différents types de micro endommagements au court d'un mécanisme de fissuration complexe avec une transition entre un régime fragile puis ductile. Ces micro-endommagements sont soit facilement identifiables sous microscopie optique comme les micro fissures linéaires développées sur plusieurs lamelles ou bien plus diffus et visibles seulement sous microscope à balayage électronique et à fluorescence comme les fissures sub-microscopiques à l'intérieur des lamelles ou les disruptions de l'arrangement des phases minérale et organique à l'échelle de la fibrille. Avec le vieillissement, la qualité du collagène s'amenuise et la proportion du contenu minéral tend à augmenter, ce qui conduit à un tissu osseux potentiellement plus fragile produisant des stimuli mécaniques modifiés comparés à l'os sain.

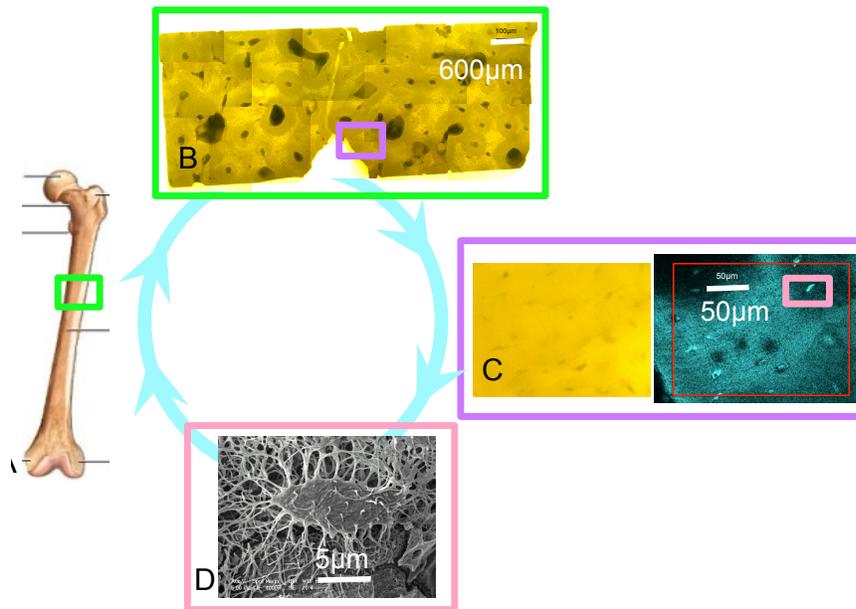


Figure 1: (A) schema d'un os de femur humain (courtesy of <http://www.daviddarling.info/encyclopedia/F/femur.html>), (B) échantillon d'os cortical humain provenant du B2OA visualisation par microscopie à lumière blanche au LBPA, (C) zoom montrant des lamelles osteonales par microscopie à lumière blanche et confocale à épifluorescence UV au LBPA, (D) lacune osteocytaire visualisée par microscopie à balayage électronique (courtesy of [8])

Les ostéocytes sont distribués à travers la microstructure à l'intérieur des lamelles ostéonales et dans l'os interstitiel (Figure 1C). Les ostéocytes sont des cellules mécanosensibles capable de percevoir les stimulations mécaniques auxquelles elles répondent en adaptant leur biologie interne ainsi qu'à tout changement dans leur micro-environnement mécanique. Les osteocytes sont logés dans les lacune ellipsoïdales à l'intérieur de la matrice extra cellulaire mineralisée au travers de laquelle les cellules projettent de nombreux filopodia dans de micro canaux appelés canaliculi. Cependant le micro-environnement mécanique des cellules humaines n'est pas précisément quantifié à cette échelle.

Néanmoins ces micro-fissures sont suspectées d'agir comme les stimuli mécaniques produisant de fortes déformations locales perçues par les cellules à travers leur nombreux canaliculi intercommuniquants [3]. Les ostéocytes sont suspectés de transcrire ce signal physique en un message chimique par un procédé appelé mécano-transduction qui amorce le remodelage des défauts. Mais la nature de ce stimulus produit par l'os endommagé sur l'ostéocyte n'est pas encore clairement identifié.

L'os cortical est un tissu qui est étudié depuis longtemps. différentes techniques expérimentales comme la micro computed tomographie par rayon X, la résonance magnétique nucléaire ou les ultra-sons permettent la détection de petites fissures. Néanmoins les mécanismes de ténacité accrue dans l'os qui opère sur plusieurs échelles de la fibre minéralisée à l'ostéon [4,5] ne sont pas mesurables par ces techniques. A l'échelle cellulaire, la microscopie à fluorescence offre les moyens nécessaires pour l'observation dynamique des phénomènes mécaniques et biochimiques. Ces observations couplées à une analyse numérique *in situ* où la morphologie est explicitée et les déformations mesurée par corrélation d'images permet une quantification des champs mécaniques sur plusieurs échelles [6,7] sans idéalisation morphologique.

Travail propose:

Le travail proposé se concentre sur l'évaluation *in situ* des champs mécaniques aux abords de la lacune ostéocytaire par des méthodes d'imagerie microscopique multi-modales (optique, fluorescence et électronique) couplées à un modèle numérique hiérarchique sur plusieurs échelles basé sur la morphologie explicite du tissu osseux et l'analyse d'images [6,7]. Les investigations duales expérimentales et numériques dans une approche top-down seront conduites pour des tests sur du tissu humain frais pour recueillir les informations mécaniques utiles durant la progression contrôlée d'endommagement sub-microscopique. La morphologie tridimensionnelle de l'ostéocyte pourra être reconstruite grâce à la microscopie confocale qui offre une possibilité de pénétration dans l'os cortical suffisante (10 microns). Les caractérisations macro-moléculaire de la matrice extra-cellulaire et des constituants intra-cellulaires (noyau, cytosquelette, cytoplasme, activité cellulaire) et sa réponse bio-chimique (dans une phase plus avancée du projet) pourront être réalisées sous microscopie à fluorescence et multi-photonique.

Le tissu osseux provient d'une collaboration avec le laboratoire B2OA de l'université Paris-Diderot. Les résultats préliminaires B2OA-LMT-LBPA sont très encourageants.

Mérite intellectuel et originalité:

Le projet s'inscrit dans la continuation du projet NSF courant d'E. Budyn et la cadre du dépôt d'une ANR en septembre dernier sur une recherche plus large sur la mécano-biologie osseuse dépendant de l'interaction entre l'ostéocyte et sa matrice extra-cellulaire sous chargement mécanique à partir de mesures globales. Le présent projet est centré sur la loge ostéocytaire spécifiquement et permet d'explorer en détail cette échelle clef, ciblée et non étudiée jusqu'à présent avec ce type de modalités expérimentales et numériques afin d'approfondir la compréhension de l'origine et des répercussions possibles de la fissuration osseuse sub-microscopique sur la biologie de la cellule osseuse. Les mécanismes locaux

de fissuration et endommagement dans l'os sont identifiables échelle par échelle par balance énergétique globale [7].

Complémentarité scientifique des différents partenaires à la réalisation du projet:

Le LMT est équipé de moyens techniques d'exploration mécanique performants sur les matériaux à fines échelles qui est une thématique importante pour ce laboratoire. Le LMT et le LBPA possèdent un microscope à balayage électronique permettant une imagerie de l'endommagement du tissu osseux à l'échelle du micron et la quantification de sa minéralisation. Le LBPA possède les techniques d'exploration microscopique à fluorescence complémentaire du LMT, puisque possible sur du tissu frais ou vivant pour en observer les propriétés organiques et mesurer les réponses cellulaires. La microscopie confocale du LBPA permet également des mesure 3D de l'environnement osteocytaire pour sa reconstruction numérique. La collaboration du LBPA et du LMT offre la possibilité d'une investigation conjuguée des aspect mécanique et biologique de l'environnement de l'ostéocyte et de sa réponse mécano-transductrice.

Le projet est porté par E. Budyn et E. Deprez, professeur des universités et Directeur de recherche CNRS à l'ENS-Cachan. E. Budyn a rejoint le LMT en Septembre après quinze d'expérience à Chicago et est spécialiste des méthodes duales expérimentales et numériques d'identification des propriétés des tissus biologiques en particulier sur l'os cortical depuis une dizaine d'années. E. Deprez est responsable de l'équipe "biophotonique et interactions moléculaire" au LBPA et est spécialiste de l'étude des interactions protéines-ADN par microscopie à fluorescence et multi-photonique en milieu cellulaire. Le projet s'inscrit dans un effort du Prof. E. Budyn de poursuivre ses recherches vers des échelles plus fines du tissu à la cellule et dans un effort du Directeur CNRS E. Deprez de poursuivre ses recherches vers des échelles plus globales de la cellule au tissu.

Budget proposé:

- personnel: un stagiaire de M2 pour 6 mois, charge de participer aux observations microscopique et à la reconstruction 3D des images pour le modèle mécanique (3,000 €).
- fonctionnement: fluorochromes et produits nécessaires à leur fabrications, milieu biologique, lamelles fines en verre, produits de nettoyage, gants, suspension de polissage, petit polissoire, petit vibreur à ultrason, usinage de petites pièces, petits matériels de connections des sensors et collecteur de mesure (10,000 €).
- dissémination: financement d'une conférence internationale pour deux personnes (2,000 €).

Total 15,000 €.

Références:

[1] G. Boivin and P. J. Meunier. The degree of mineralization of bone tissue measured by computerized quantitative contact microradiography. *Calcified Tissue International*, 70:503-511, 2002.

- [2] P. Fratzl and R. Weinkamer. Natures hierarchical materials. *Progress in Material Sciences*, 52:1263-1334, 2007.
- [3] X Sun, E McLamore, V Kishore, M Slipchenko, D M Porterfield, and O Akkus. Mechanical stretch induced calcium efflux from bone matrix stimulates osteoblasts. *Bone*, 50:581-591, 2012.
- [4] KJ Koester, JW Ager, and RO Ritchie. The true toughness of human cortical bone measured with realistically short cracks. *Nature Materials*, 7:672-677, 2008.
- [5] A.A. Poudarik, T. Diab, G.S. Sroga, A. Ural, A. L. Boskey, C.M. Cundberg and D. Vashishth. Dilatation band formation in bone. *PNAS*, 2013.
- [6] E Budyn and T Hoc. Analysis of micro fracture in human haversian cortical bone under transverse tension using extended physical imaging. *International Journal of Numerical Methods in Engineering*, 82(8):940-965, 2010.
- [7] J Jonvaux, T Hoc, and E Budyn. Analysis of micro fracture in human Haversian cortical bone under compression. *International Journal of Numerical Methods in Biomedical Engineering*, 28(9):974-998, 2012.
- [8] P.D. Pajevic. Regulation of bone resorption and mineral homeostasis by osteocytes, *IBMS BoneKey*, 6(2):63-70, 2009. Doi: 10.1138/20090363