

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

IMPACT DE L'HÈME LIBRE SUR LA MIGRATION, LA FLUIDITÉ MEMBRANAIRE ET LA DYNAMIQUE
DE L'ACTINE DES OSTÉOBLASTES DANS UN CONTEXTE D'HÉMOLYSE AIGUË

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

CHARLES LAPOINTE

OCTOBRE 2025

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.12-2023). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier ma directrice de recherche Tatiana Scorza de m'avoir donné l'opportunité d'intégrer son laboratoire de recherche. Son encadrement, ses conseils, son soutien, ainsi que sa bienveillance tout au long de ma maîtrise m'ont permis de me développer comme chercheur, mais aussi comme individu. Sa passion pour la recherche, son travail exemplaire comme chercheuse, professeure et directrice du département de biologie m'ont inspiré. Tatiana, je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi pendant cette maîtrise.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance envers mes collègues de laboratoire pour leur soutien tout au long de ma maîtrise. Je remercie Arleth Pozo de Lugo et Nicolas Pouderous qui m'ont enseigné avec patience tout au long du projet et qui ont soutenu mes idées avec bienveillance. Je suis également reconnaissant envers Philippe St-Louis, qui m'a guidé non seulement durant mon stage avant la maîtrise, mais aussi tout au long de celle-ci.

J'aimerais aussi remercier les membres du jury d'avoir pris le temps de lire mon projet de mémoire et d'avoir émis leurs recommandations et leurs corrections. Je souhaite adresser des remerciements à l'équipe technique du pavillon des sciences biologiques de l'UQAM. Marie-Josée Carbonneau et Serge Paquet pour leurs écoutes et leur soutien lors de mes contrats d'auxiliaire de laboratoire. Grégoire Bonnamour pour son aide généreuse et bienveillante à la plateforme du CERMO.

Merci à ma famille François, Louise, Richard et Geneviève pour votre soutien inconditionnel. Merci à ma tante Noëlle-La Delavienouvelle et son conjoint Marc Trudel de m'avoir mis sur le chemin du savoir et de la science. Merci à Alex Léveillé un ami exceptionnel pour tous tes conseils et toutes les heures à cogiter philosophiquement ensemble. Merci à ma défunte belle-mère, Sylvie Ouellet d'avoir toujours cru en moi.

Finalement, j'aimerais remercier particulièrement ma conjointe. Alexe Ouellet-Boudreault merci d'avoir accepté avec compréhension que je me lance dans des études en sciences à l'âge de 26 ans, sachant que ceci allait mettre en pause bon nombre de projets pour nous deux. Merci de m'avoir supporté, encouragé, aimé et ça même dans les moments les plus difficiles de mon parcours. Je me sens choyé d'avoir une conjointe aussi indulgente et intelligente que toi à mes côtés.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
LISTE DES FIGURES.....	v
LISTE DES TABLEAUX	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	vii
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS	ix
RÉSUMÉ	x
ABSTRACT	xi
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 ÉTAT DES CONNAISSANCES	4
1.1 Introduction à la structure des os	4
1.2 Le remodelage osseux.....	5
1.3 Anémie et hémolyse	7
1.3.1 Les érythrocytes.....	7
1.3.2 Classification de l'anémie	8
1.3.3 Classification de l'hémolyse.....	8
1.4 L'hème.....	9
1.4.1 Structure et état de l'ion de fer	9
1.4.2 Rôles types	10
1.4.3 Rôles émergents	10
1.4.4 Régulation de la concentration de l'hème libre par l'hème oxygénase	11
1.4.5 Toxicité de l'HE libre	13
1.5 La santé osseuse mise à l'épreuve : liens entre l'anémie hémolytique et l'ostéoporose	13
1.6 Rôle du mouvement cellulaire dans le remodelage osseux.....	15
1.6.1 Introduction au mouvement cellulaire	15
1.6.2 La migration cellulaire et son importance dans le remodelage osseux.....	16
1.7 Le cytosquelette et son rôle dans la migration cellulaire	18
1.7.1 La F-actine : élément essentiel dans la poussée membranaire et la formation des protrusions.....	18
1.7.2 Impact de l'HE sur le réseau d'actine	23
1.8 La Cofiline	24
1.8.1 Structure, fonction et régulation de la cofiline.....	24
1.8.2 Les effets de l'HE sur la cofiline	25
1.9 Hypothèse et objectifs	26

CHAPITRE 2 MATÉRIELS ET MÉTHODES	28
2.1 Culture cellulaire et traitement	28
2.2 Préparation de l'HE	28
2.3 Test de migration par éraflure dans la monocouche cellulaire.	28
2.4 Récupération de la fluorescence après photoblanchiment (FRAP)	29
2.5 Marquage par sonde fluorescente de l'actine	30
2.5.1 Analyse par confocale	30
2.5.2 Analyse de l'actine par cytofluorométrie en flux.....	31
2.6 Immunobuvardage.....	31
CHAPITRE 3 RÉSULTATS.....	33
3.1 Inhibition de la migration cellulaire des cellules MG63 par l'HE	33
3.2 Effet transitoire de l'HE sur la fluidité de la membrane plasmique.....	35
3.3 Impacte de l'hémine sur la dynamique de l'actine	37
3.4 Augmentation de l'expression de la cofiline.....	41
CHAPITRE 4 DISCUSSION	43
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	51
ANNEXE A Images représentant un Z-stack au confocal.....	54
ANNEXE B Stratégie d'analyse de la Cytofluorométrie	55
BIBLIOGRAPHIE.....	56

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation moléculaire de Lewis de l'HE et de l'hème (Figure modifiée tirée de (Carrasco-Pozo <i>et al.</i> , 2020)	10
Figure 2 : Cascade de signalisation de trois Rho GTPase (Rho, Rac, Cdc42) menant à leurs fonctions clefs et mettant en évidence leurs effecteurs principaux en aval.	22
Figure 3 : Diminution de la vitesse de migration des cellules MG63 traitées avec l'HE	34
Figure 4 : Baisse de la fluidité membranaire induite par l'HE à 1 heure et rétablissement corrélé à l'induction de HO-1 à 5 heures.....	36
Figure 5 : Baisse de la F-actine, sans effet sur la G-actine, chez des cellules MG63 traitées avec de l'HE .	39
Figure 6 : Analyse de la dynamique de l'actine sous un traitement de Cytochalasine E et de l'HE chez les cellules Jurkat	40
Figure 7 : Effet de l'HE sur l'expression de la forme active et inactive de la cofiline	42
Figure 8 : Exemple d'empilement de plans Z (Stack 3D) par confocale des MG63 témoin.	54
Figure 9 : Stratégie d'analyse de la dynamique de l'actine par cytofluorométrie en flux.	55

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Liste non exhaustive des protéines liant l'actine (ABP) dont la fonction principale est de réguler la polymérisation de l'actine	20
--	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ABP : Protéines liant l'actine (actin binding protein)
ADP : Adénosine diphosphate
ALP : Phosphatase alcaline
ATP : Adénosine triphosphate
Bach1 : Facteur de transcription Btb et Cnc homologue 1
Bach2 : Facteur de transcription Btb et Cnc homologue 2
BMP : Protéine morphogénétique osseuse
BMU : Unité multicellulaire de l'os
BRC : Compartiment du remodelage osseux
CIN : Phosphatases chronophin
CP : Cystéine-Proline
CSF : Facteurs stimulant les colonies
CTX : Télopeptide C-terminal
CytE : Cytochalasine E
F-actine : Filament d'actine
FRAP : Récupération de la fluorescence après photoblanchiment
G-actine : Monomère d'actine
GEF : Facteurs d'échange de guanine
HBM : Heme binding motifs
HE : Hémine
HO-1 : Hème oxygénase 1
IGF-1 : Facteurs de croissance de type insuline 1
IGF-2 : Facteurs de croissance de type insuline 2
IL-1 : Interleukines 1
IL-6 : Interleukines 6
LIMK : Kinase LIM
M-CSF : Facteur de stimulation des colonies de macrophages
mDIA : Effecteur homologue mammalien de Diaphanous
MLC : Chaîne légère de la myosine
NESK : Kinase embryonnaire spécifique de type NIK
NFATc1 : Facteur nucléaire des cellules T activées cytoplasmique 1
NLS : Séquence de localisation nucléaire
NRK : Kinase apparentée à NIK
OCN : Ostéocalcine
OSBs : Ostéoblastes
OSCs : Ostéoclastes
P1NP : Propeptide N-terminal intact du procollagène de type I

PAK : kinase activée p21
PCR : Réaction de polymérisation en chaîne
PDGF : Facteurs de croissance dérivés des plaquettes
PHZ : Phénylhydrazine
PLC : Phospholipase C
PTH : Parathormone
PVDF : Membrane de polyfluorure de vinylidène
RANKL : ligand activateur des récepteurs de facteur nucléaire kappa-B
Rho-GTPases : Guanosines-triphosphates homologues à Ras
ROCK : Kinase à domaine enroulé en hélice associée à Rho
ROI : Régions d'intérêt
ROS : Espèces réactive de l'oxygène
RT-qPCR : PCR quantitative en temps réel après transcription inverse
RUNX2 : Facteur de transcription runt-related 2
SASP : Phénotype sécrétoire associé à la sénescence
Ser3 : Sérine 3
SSH : Slingshot protein
SVF : Sérum de veau fœtal
TESK : Kinase testiculaire
TGF- β : Facteur de croissance transformant bêta
TRAP5b : Phosphatase acide 5 tartrate-résistante
VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

Femtolitre : fl

Micromolaire : μM

Microlitre : μL

Millimolaire : mM

Nanomètre : nm

RÉSUMÉ

L'hème (protoporphyrine IX ferrique) libre dans le plasma est un marqueur distinct des pathologies hémolytiques comme le paludisme, la thalassémie et la drépanocytose. Ces pathologies sont toutes liées à une perte de masse osseuse (ostéoporose). Moreau et *al.* (2012) ont démontré, dans un modèle murin, qu'une hémolyse aiguë induite par une infection parasitaire (*Plasmodium chabaudi adami*) ou par un agent hémolytique (phénylhydrazine (PHZ)), diminue rapidement la minéralisation osseuse et entraîne une réduction notable, en 8 jours, de la densité des tissus osseux trabéculaires. Ces pathologies entraînent une hémolyse intravasculaire, provoquant une libération excessive d'hémoglobine et d'hème, ce dernier rapidement oxydé en hémine (HE), avec des concentrations plasmatiques pouvant excéder 20 μ M. Cette perte rapide de masse osseuse a été reproduite *in vivo* par notre laboratoire chez des souris BALB/c recevant des injections intrapéritonéales d'HE (10 mg/kg pendant trois jours consécutifs sur deux semaines). Une diminution des concentrations sériques d'ostéocalcine (OCN), de propeptide N-terminal intact du procollagène de type I (P1NP) et de la phosphatase acide 5 tartrate-résistante (TRAP5b) suggèrent respectivement une réduction de la formation osseuse et du nombre d'ostéoclastes (OSCs). De plus, des résultats *in vitro* ont mis en évidence l'effet négatif de l'HE sur la migration des ostéoblastes (OSBs), ainsi que la fusion des précurseurs ostéoclastique et leur différenciation en OSCs mature.

Sur la base de ces observations, nous avons analysé davantage les effets de l'HE sur la fluidité membranaire et la dynamique de l'actine, deux processus clés impliqués dans la migration, la fusion et l'adhésion cellulaire. Pour ce faire, la lignée cellulaire de l'ostéosarcome humain MG63 a été utilisée. Un test de migration a confirmé que l'HE retarde la migration des MG63. L'analyse par la technique de récupération de la fluorescence après photoblanchiment (FRAP) a démontré que l'intercalation de l'HE entraîne une rigidification transitoire de la membrane plasmique, avec un retour à la normale après 5 heures, concordant avec l'induction de l'hème oxygénase 1 (HO-1) qui catalyse la dégradation de l'HE. Bien que la rigidification membranaire induite par l'HE atteigne un maximum après environ 1 heure d'incubation avant de diminuer, elle ne semble pas constituer directement la cause du ralentissement de la migration, constaté qu'après 14 heures de traitement. Il est néanmoins possible que l'HE induise rapidement une signalisation cellulaire, dès les premières minutes ou heures d'exposition, qui initie ensuite un remodelage progressif du cytosquelette d'actine et contribue secondairement à la diminution de la migration. L'imagerie confocale des filaments d'actine (F-actine) et des monomères d'actine (G-actine), ainsi que l'immunobuvardage de la cofiline, une protéine auxiliaire augmentant la dissociation des F-actine, suggèrent ensemble que l'HE perturbe la migration ostéoblastique en modifiant la réorganisation du cytosquelette d'actine, possiblement en augmentant la forme active de la cofiline.

Mots clés : Maladies hémolytiques, Hème/hémine, Remodelage osseux, Ostéoporose, Migration cellulaire, Fluidité/rigidité membranaire, Hème oxygénase-1, Dynamique de l'actine, Cofiline, Ostéoblaste/MG63

ABSTRACT

Free heme (ferric protoporphyrin IX) in plasma is a hallmark of hemolytic pathologies such as malaria, thalassemia, and sickle cell disease. These conditions have all been linked to bone mass loss (referred to as osteoporosis). This phenomenon was observed *in vivo* by Moreau et al. (2012), where, in a murine model, acute hemolysis induced by either a parasitic infection (*Plasmodium chabaudi adami*) or a hemolytic agent (Phenylhydrazine) rapidly reduced bone mineralization and led to a significant decrease in trabecular bone tissue density in 8 days. These pathologies cause intravascular hemolysis, resulting in excessive release of hemoglobin and free heme, which is rapidly oxidized into hemin (HE), reaching plasma concentrations that can exceed 20 μ M. This rapid bone mass loss was reproduced *in vivo* by our laboratory in BALB/c mice subjected to intraperitoneal injections of HE (10 mg/kg) for three consecutive days over a total period of two weeks. The decrease in serum concentrations of OCN, P1NP, and TRAP5b suggests a reduction in bone formation and osteoclast numbers, respectively. Additionally, *in vitro* results have highlighted the negative effects of HE on osteoblastic cell migration, osteoclast precursor fusion and maturation.

Based on these observations, we further analyzed the effects of HE on membrane fluidity and actin dynamics, two key processes involved in migration, fusion, and cell adhesion. To this end, the human osteosarcoma cell line MG63 was used. A migration assay confirmed that HE delays MG63 migration. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) analysis demonstrated that HE intercalation induces a transient stiffening of the plasma membrane, with a return to baseline after 5 hours, consistent with the induction of heme oxygenase-1 (HO-1), which catalyzes HE degradation. Although HE-induced membrane stiffening reaches a maximum after approximately 1 hour of incubation before decreasing, it does not appear to directly account for the migration slowdown, which is only observed after 14 hours of treatment. Nevertheless, it is possible that HE rapidly triggers cellular signaling within the first minutes or hours of exposure, subsequently initiating a progressive remodeling of the actin cytoskeleton that secondarily contributes to reduced migration. Confocal imaging of actin filaments (F-actin) and actin monomers (G-actin), along with immunoblotting of cofilin, an auxiliary protein that enhances F-actin depolymerization, collectively suggest that HE disrupts osteoblast migration by altering actin cytoskeleton reorganization, possibly through increased activation of cofilin.

Keywords: Hemolytic diseases, Heme/hemin, Bone remodeling, Osteoporosis, Cell migration, Membrane fluidity/stiffness, Heme oxygenase-1, Actin dynamics, Cofilin, Osteoblast/MG63

INTRODUCTION

Le remodelage osseux est un processus dynamique et continu impliquant la résorption de la matrice osseuse par les ostéoclastes (OSCs), suivis par sa formation *de novo* par les ostéoblastes (OSBs). Dans un scénario homéostatique, le remodelage osseux élimine les zones endommagées ou vieilles de la matrice osseuse et les remplace par de nouvelles matrices saines et fonctionnelles, assurant ainsi l'intégrité et l'adaptation de l'os aux contraintes mécaniques et métaboliques (Bolamperti *et al.*, 2022). Toutefois, cet équilibre peut être perturbé par l'hémolyse intravasculaire, une condition présente dans certaines pathologies telles que la malaria, la drépanocytose et la thalassémie, toutes associées à une perte de masse osseuse (Behzadifard *et al.*, 2024 ; Hernigou *et al.*, 2003 ; Moreau *et al.*, 2012). Une étude antérieure de notre laboratoire, menée sur des souris BALB/c, a démontré qu'une infection aiguë par *Plasmodium chabaudi adami*, un parasite induisant la lyse progressive des érythrocytes, ainsi qu'un traitement à la PHZ, un agent hémolytique provoquant une hémolyse aiguë, entraînent une réduction significative et rapide de la densité osseuse minéralisée, ainsi que les tissus osseux trabéculaires (Moreau *et al.*, 2012).

Lors de telles hémolyses intravasculaires, on observe une destruction massive des érythrocytes dans la circulation sanguine. Cette lyse provoque alors une libération importante d'hémoglobine, qui s'oxyde rapidement formant de la méthémoglobine, et libère les groupements prosthétiques d'hème, rapidement oxydés en HE (Carrasco-Pozo *et al.*, 2020 ; Layer, 2020). Les mécanismes de protection impliquant entre autres, l'haptoglobine, l'hémopexine et l'albumine protègent initialement l'organisme des effets toxiques de ces molécules (Vallelian *et al.*, 2022). Toutefois, l'augmentation excessive des concentrations d'hème/HE et d'hémoglobine/méthémoglobine entraîne la saturation des mécanismes de protection, ce qui conduit à une accumulation plasmatique toxique d'hème/HE pouvant atteindre plus de 20 μ M (Arruda *et al.*, 2004).

Notre Laboratoire a ensuite reproduit une ostéoporose rapide chez des souris BALB/c soumises à des injections d'HE à des doses relativement comparables à celles retrouvées lors d'épisodes hémolytiques aigus (10 mg/kg, par voie intrapéritonéale). Les résultats étaient alors similaires à ceux rapportés par l'équipe de Moreau *et al.*, (2012). Plus précisément, une diminution marquée du nombre de progéniteurs ostéoclastiques et de leur capacité à fusionner pour former des OSCs multinucléés matures sans modification des marqueurs de résorption (télopeptide C-terminal (CTX)) a été mis de

l'avant. De plus, les marqueurs sériques de formation osseuse, tel que l'ostéocalcine (OCN) et le Propeptide N-terminal intact du procollagène de type I (P1NP) étaient diminués significativement, ce qui suggère une diminution de la formation osseuse.

D'autres résultats récents de notre laboratoire ont aussi mis en évidence que l'HE a un impact négatif sur la migration des cellules ostéoblastiques, la formation des OSCs à partir des précurseurs hématopoïétiques murins, et la fusion des macrophages dérivés de la moelle osseuse, ainsi que la fusion des lignées de monocytes/macrophages *in vitro*. Le bon fonctionnement de ces processus cellulaires dépend en grande partie d'une réorganisation appropriée du cytosquelette (Faust *et al.*, 2019 ; S.R. Goodman, 2008). En ce sens, diverses études ont montré que l'HE peut altérer le fonctionnement du cytosquelette et en particulier de l'actine (Homan *et al.*, 2022 ; Martins *et al.*, 2016 ; Solar *et al.*, 1991). Spécifiquement, une étude a démontré que l'HE stimule l'expression de la cofiline chez les cellules microgliales, la cofiline étant une protéine auxiliaire impliquée dans la régulation de l'actine; la migration de ces cellules était ainsi diminuée (Sayeed *et al.*, 2017). De plus, par sa nature hydrophobe, l'hème/HE traverse et s'insère dans les bicouches lipidiques membranaires et accède à un grand réservoir lipidique (Shaklai *et al.*, 1985). Participant aux réactions de Fenton et de Haber-Weiss par l'intermédiaire de son atome de fer, l'hème/HE conduit à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ce qui provoque la peroxydation des phospholipides et des protéines membranaires, notamment des protéines de l'actine (Kozlova *et al.*, 2014 ; Solar *et al.*, 1991). Ainsi, l'hème/HE endommage et rigidifie les membranes cellulaires (Destro Bisol, 1999 ; Gaudreault *et al.*, 2015), un effet qui a été associée à une diminution de la migration cellulaire (Gardeta *et al.*, 2022 ; Glatzel *et al.*, 2018 ; Gojova et Barakat, 2005).

Dans cette étude, nous avons utilisé la lignée ostéoblastique MG63, qui constitue un modèle *in vitro* pertinent et reproductible pour l'étude de processus liés aux ostéoblastes (Staehlke *et al.*, 2019). Leur morphologie, l'expression de récepteurs d'adhésion, la régulation du cycle cellulaire ainsi que leurs voies de signalisation intracellulaire demeurent stables pendant plusieurs passages (P5-P30)(Staehlke *et al.*, 2019). Elle nous semble donc bien adaptée pour l'analyse préliminaire de l'impact potentiel de l'HE sur la fluidité de la membrane plasmique et la dynamique de l'actine, deux processus essentiels pour la migration cellulaire.

Nous avons émis l'hypothèse que l'HE peut altérer la vitesse de migration cellulaire par deux mécanismes distincts : d'une part, en diminuant la fluidité membranaire suite à son intercalation dans les membranes, et d'autre part, en modifiant la dynamique de l'actine par une perturbation des protéines accessoires de l'actine, telle la cofiline, qui est impliquée dans la dépolymérisation des F-actine (Bravo-Cordero *et al.*, 2013 ; Wioland *et al.*, 2017).

Afin de vérifier notre hypothèse, nous avons évalué l'effet de l'HE sur la migration des cellules MG63 en réalisant un test de migration. Nous avons ensuite déterminé l'impact de l'intercalation membranaire de l'HE sur la fluidité membranaire par FRAP. Par ailleurs, nous avons évalué par microscopie confocale l'intégrité, la distribution et la polymérisation de l'actine en réponse à un traitement à l'HE. Enfin, nous avons évalué l'impact possible de l'expression protéique totale de la cofiline ainsi que l'équilibre entre ses formes active (non phosphorylée) et inactive (phosphorylée) par immunobuvardage.

CHAPITRE 1

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Introduction à la structure des os

L'os est un tissu connectif spécialisé, d'origine mésenchymateuse, pouvant être séparé en deux types d'organisations structurels : l'os compact et l'os spongieux. Dense et rigide, l'os compact assure la résistance mécanique de compression. Plus poreux, l'os spongieux participe aux échanges métaboliques et allège la structure osseuse (Black et Tadros, 2020). Outre cette organisation macroscopique, l'os présente une structure microscopique complexe, permettant à ces deux structures de s'organiser en unités fonctionnelles adaptées à chacun de leurs rôles. Les ostéons, qui sont l'unité de base de l'os compact, s'orientent parallèlement à l'axe de l'os. Leurs structures matricielles cylindriques en anneau leur permettent de supporter les contraintes mécaniques (Black et Tadros, 2020). Ceux-ci sont ensuite formés de lamelles osseuses concentriques, disposées autour d'un canal de Havers, qui abritent des vaisseaux sanguins et des nerfs. Ce système dense d'ostéons est interrelié par des canaux permettant la communication vasculaire et l'apport nutritif. Pour sa part, l'os spongieux est constitué de trabécules osseuses formant une structure réticulaire parallèle à l'axe de l'os (Black et Tadros, 2020); ceci lui permettant de supporter l'os compact en répartissant la force de compression, tout en diminuant son poids. Les espaces intertrabéculaires abritent et protègent la moelle osseuse, organe clé dans l'hématopoïèse (Black et Tadros, 2020).

La matrice osseuse est constituée d'une portion inorganique ($\approx 70\%$) et d'une portion organique ($\approx 30\%$) (Desoutter *et al.*, 2012). La portion inorganique est principalement constituée de cristaux d'hydroxyapatites ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})$), n'étant pas présente sous une forme chimiquement pure à 100% (Desoutter *et al.*, 2012). Pour sa part, la fraction organique de l'os est principalement composée de collagènes de type I, III et V, où le collagène de type I représente environ 90 % de cette portion (Desoutter *et al.*, 2012). Le 10 % restant inclut des protéoglycanes spécifiques à l'os, des protéines matricielles non collagéniques (OCN, Ostéonectine, Ostéopontine et Sialoprotéine osseuse II), ainsi que des cytokines et des facteurs de croissance (Boskey, 2013 ; Mohamed, 2008). Parmi ces derniers, on retrouve le facteur de croissance transformant bêta ($\text{TGF-}\beta$), les facteurs de croissance de type insuline 1 et 2 (IGF-1 et IGF-2), les protéines morphogénétiques osseuses (BMP), les facteurs de croissance dérivés des plaquettes (PDGF), ainsi que les interleukines (IL)-1 et IL-6, et les facteurs stimulant les colonies (CSF) (Black et Tadros, 2020).

Par sa structure et sa composition unique, l'os accomplit plusieurs fonctions. Tout d'abord, il assure un soutien mécanique et protège les tissus mous. De plus, il joue un rôle dans l'homéostasie des minéraux, stockant des minéraux tels que le calcium, le phosphate, le potassium et le sodium. Il est aussi le siège de l'hématopoïèse, en abritant la moelle osseuse (Burr, 2019 ; Florencio-Silva et al., 2015). Enfin, il possède un rôle endocrinien, notamment lors de la résorption osseuse où les minéraux, les protéines matricielles non collagéniques, les cytokines et les facteurs de croissance sont libérés dans le micro-environnement et la circulation sanguine (Zhou *et al.*, 2021a).

1.2 Le remodelage osseux

Le remodelage osseux est un processus physiologique complexe qui permet le renouvellement constant du tissu osseux, garantissant ainsi la solidité, la régénération et l'adaptation de l'os aux contraintes mécaniques et métaboliques. Ce processus est régulé par une grande diversité de facteurs biochimiques, hormonaux et mécaniques, et repose sur des interactions dynamiques et constantes d'une organisation cellulaire appelée unité multicellulaire de l'os (BMU de l'anglais *Bone Multicellular Units*) (Bolamperti *et al.*, 2022 ; Daponte *et al.*, 2024 ; Kenkre et Bassett, 2018). Cette dernière, est composée des ostéoclastes (OSCs) qui dégradent l'os, des ostéoblastes (OSBs) qui reconstruisent l'os, des ostéocytes et des cellules du revêtement (Arias *et al.*, 2018).

Le remodelage osseux est stimulé soit spontanément ou en réponse à des stimuli spécifiques, telles les variations systémiques de la parathormone (PTH), ou des signaux locaux, comme les microdommages de la matrice osseuse, et l'apoptose des ostéocytes (Allen et Burr, 2019). Quel que soit le mécanisme déclencheur, le remodelage osseux suit un cycle qui se déroule en cinq étapes distinctes: l'activation, la résorption, l'inversion, la formation et une phase passive (Allen et Burr, 2019 ; Daponte *et al.*, 2024).

Tout d'abord, la phase d'activation débute le processus de remodelage en créant un environnement propice à l'arrivée des précurseurs ostéoclastiques. Pour ce faire, les cellules du revêtement osseux de la région se séparent de la matrice osseuse subjacente, créant le compartiment du remodelage osseux (BRC) (Allen et Burr, 2019 ; Kenkre et Bassett, 2018).

Les précurseurs ostéoclastiques, différenciés à partir des progéniteurs hématopoïétiques myéloïdes, migrent vers la surface osseuse en réponse à des signaux locaux ou stochastiques. Sous l'effet combiné du ligand activateur des récepteurs de facteur nucléaire kappa-B (RANKL), du facteur de stimulation des

colonies de macrophages (M-CSF) et du facteur nucléaire des cellules T activées cytoplasmique 1 (NFATc1), ces précurseurs subissant une différenciation en pré-OSCs (Florencio-Silva *et al.*, 2015). Toujours sous l'influence du RANKL, ils poursuivent leur maturation par un réarrangement du cytosquelette, aboutissant à la fusion de leurs membranes plasmiques et à la formation de cellules multinucléées matures et fonctionnelles (Florencio-Silva *et al.*, 2015 ; Kenkre et Bassett, 2018).

Une fois matures, les OSCs amorcent la phase de résorption en formant une zone étanche entre leur membrane plasmique et la matrice osseuse, connue sous le nom de lacune de Howship (Florencio-Silva *et al.*, 2015). Les OSCs procèdent ensuite à une résorption active de la matrice en acidifiant la lacune; ce processus repose sur l'action de l'anhydrase carbonique II, qui segmente l'acide carbonique (H_2CO_3) en protons d'hydrogène (H^+) et en ions bicarbonate (HCO_3^-). Par la suite, des canaux Cl^- et des pompes H^+ -ATPase s'activent pour transporter les H^+ et les anions Cl^- du cytosol de l'OSC vers la lacune de Howship, ce qui maintient l'électroneutralité de la zone de résorption tout en l'acidifiant (Florencio-Silva *et al.*, 2015 ; Kenkre et Bassett, 2018).

La phase d'inversion, qui suit la résorption osseuse, agit comme une étape de transition vers la phase de formation des OSBs. Bien que la compréhension de cette étape soit incomplète, elle semble impliquer l'arrêt de la résorption, la préparation de la surface osseuse et le recrutement des OSBs (Allen et Burr, 2019).

La phase de formation osseuse se décompose en deux étapes distinctes et est réalisée principalement par les OSBs. La première est la déposition d'ostéoïde, une matrice organique non minéralisée composée essentiellement de fibres de collagène de type I (Desoutter *et al.*, 2012). Cette matrice sert de support pour le dépôt ultérieur des cristaux inorganiques d'hydroxyapatite caractérisant la deuxième étape de la phase de formation osseuse. Pendant cette phase de minéralisation, les OSBs contrôlent l'incorporation d'ions calcium et phosphate entre les fibres de collagène. Finalement, une fois cette phase terminée, les OSBs suivent deux voies. D'une part, les OSBs peuvent entrer en apoptose, qui est une mort cellulaire programmée, permettant ainsi de libérer de l'espace étant nécessaire à la poursuite de la formation osseuse (Allen et Burr, 2019). D'autre part, les OSBs peuvent être incorporés dans l'ostéoïde et se différencier en ostéocytes, leur permettant ensuite de jouer un rôle dans la régulation de l'os (Allen et Burr, 2019). Enfin, la phase passive se caractérise par le recouvrement de la zone remodelée par les cellules

du revêtement osseux, assurant ainsi sa protection et favorisant la minéralisation progressive sur le long terme (Allen et Burr, 2019 ; Kenkre et Bassett, 2018).

1.3 Anémie et hémolyse

1.3.1 Les érythrocytes

Les érythrocytes des mammifères sont des cellules anucléées, responsables du transport de l'oxygène et du dioxyde de carbone dans le sang. Ces cellules ont une durée de vie moyenne d'environ 120 jours chez l'humain, au cours desquels elles circulent dans le système sanguin afin de garantir le transport d'oxygène vers les tissus de l'organisme tout en contribuant à maintenir l'équilibre acido-basique (Kuhn *et al.*, 2017). Ces cellules biconcaves, mesurent entre 8 à 10 μm de diamètre, avec une épaisseur variante entre 2,5 μm au pourtour et 1 μm en leur centre (Thiagarajan *et al.*, 2021). Cette morphologie particulière leur confère une grande souplesse membranaire, leur permettant de circuler dans des environnements à diamètre réduit, tels que les capillaires (2 à 5 μm) et les sinus veineux de la rate (2 μm) (Thiagarajan *et al.*, 2021).

Les passages répétés des érythrocytes dans des environnements étroits engendrent un stress physique constant, conduisant à une perte progressive de leur capacité à se déformer et réduisant leur durée de vie (Corrons *et al.*, 2021). En plus, tout au long de leur cycle de vie, les érythrocytes subissent également des stress chimiques, notamment liés à la libération d'oxygène par l'hémoglobine (Thiagarajan *et al.*, 2021). Ce processus génère des ROS oxydants, d'une part le groupement thiol de certaines protéines et d'autre part les lipides membranaires. Ces oxydations causent une altération de la membrane plasmique, se traduisant par une augmentation de la rigidité membranaire, et l'apparition de corps de Heinz, résultant de la conversion de l'hémoglobine en produit insoluble (Baba et Bhatnagar, 2018 ; Thiagarajan *et al.*, 2021). La modification de l'hémoglobine en méthémoglobine a lieu progressivement au cours du vieillissement de l'érythrocyte, lui faisant perdre sa capacité de lier l'oxygène, due à l'oxydation de l'ion ferreux (Fe^{2+}) en ion ferrique (Fe^{3+}) (Thiagarajan *et al.*, 2021).

Pour contrer ces effets, les érythrocytes possèdent divers mécanismes de réparation qui contribuent à leur persistance et à leur maintien en circulation jusqu'à leur élimination physiologique (Kuhn *et al.*, 2017). À terme, lorsqu'ils sont trop endommagés, ils sont éliminés par phagocytose, impliquant les macrophages réticulo-endothéliaux de la rate et du foie, permettant d'éviter une lyse intravasculaire (Mebius et Kraal, 2005).

1.3.2 Classification de l'anémie

L'anémie est une condition caractérisée par une diminution du taux d'hémoglobine dans le sang, entraînant une réduction du transport d'oxygène vers les tissus de l'organisme (Turner *et al.*, 2025). Elle peut être classée en fonction du volume corpusculaire moyen (VCM), une mesure qui reflète la taille moyenne des érythrocytes exprimés en femtolitres (fl). On distingue, dans cette classification, trois formes principales d'anémies : la normocytaire, la microcytaire et la macrocytaire (Baldwin *et al.*, 2022). L'anémie hémolytique, en particulier, appartient à la catégorie des anémies normocytaires, caractérisée par un VCM compris entre 80 et 100 fl (Baldwin *et al.*, 2022).

Une autre classification de l'anémie repose sur l'identification de ses causes et mécanismes sous-jacents. L'anémie, par exemple, peut résulter d'une perte sanguine importante, notamment lors d'un traumatisme ou d'une hémorragie sévère. L'anémie peut être aussi attribuée à une diminution de l'érythropoïèse, généralement suivie par une production réduite d'érythrocytes, comme c'est le cas de l'anémie ferriprive, l'anémie aplasique et maladie rénale chronique, résultant de la réduction de la production d'érythrocytes (Batchelor *et al.*, 2020 ; Giudice et Selleri, 2022 ; Saurin, 2010). Enfin, elle peut être causée par une destruction accrue des érythrocytes, appelée hémolyse (Baldwin *et al.*, 2022).

1.3.3 Classification de l'hémolyse

L'hémolyse se caractérise par une perturbation membranaire qui entraîne une destruction accélérée des érythrocytes en circulation par rapport à leur régénération compensatoire de la moelle osseuse (Siddon et Tormey, 2019). Elle peut être subdivisée en deux types : l'hémolyse intravasculaire et l'hémolyse extravasculaire (Siddon et Tormey, 2019). L'hémolyse intravasculaire est retrouvée dans les formes sévères de la malaria, la drépanocytose et la thalassémie, et se traduit généralement par une importante destruction d'érythrocytes dans la circulation sanguine et par la libération d'hémoglobine et d'hème dans le plasma (Baldwin *et al.*, 2022 ; Ballas, 1990 ; Mendonça *et al.*, 2016). L'hémoglobine et l'hème libre sont rapidement oxydés en méthémoglobine et en HE, respectivement (Belcher *et al.*, 2010); la majorité de l'hémoglobine et de l'hème libre sont rapidement captées par des systèmes de protection, comme l'haptoglobine et l'hémopexine (Chiabrando *et al.*, 2014).

L'hémolyse extravasculaire se caractérise par une élimination précoce des érythrocytes dans un environnement contrôlé, principalement au niveau du système réticulo-endothélial de la rate et du foie

(Siddon et Tormey, 2019). Elle est généralement subdivisée en deux autres catégories, qui sont l'hémolyse extravasculaire intra-corpulaire et l'hémolyse extravasculaire extra-corpulaire (Baldwin *et al.*, 2022). L'hémolyse intra-corpulaire fait référence à des anomalies intrinsèques aux érythrocytes, tandis que l'hémolyse extra-corpulaire est principalement causée par des facteurs extrinsèques aux érythrocytes (Baldwin *et al.*, 2022). Parmi les causes extrinsèques, on retrouve des maladies auto-immunes d'origine génétique, telle que l'anémie hémolytique auto-immune chaude, la maladie hémolytique du fœtus/nouveau-né, mais aussi l'hémolyse allo-immune médiée par des anticorps non-ABO suite à une transfusion (Flegel, 2015 ; Hall et Avulakunta, 2023 ; Kalfa, 2016 ; Siddon et Tormey, 2019). L'un des grands impacts lors de cette destruction massive d'érythrocytes est une libération d'hémoglobine et d'hème dans le plasma sanguin, pouvant atteindre des concentrations supérieures à 20 μM (Arruda *et al.*, 2004). Ces concentrations non physiologiques d'hème libre sont insoluble dans l'eau et extrêmement toxiques pour l'organisme (Arruda *et al.*, 2004). Dans cette situation, les molécules de détoxification, tels que l'haptoglobine, l'hémopexine et l'albumine sérique deviennent saturées, et cette saturation entraîne des effets toxiques, principalement sous forme de ROS, affectant des protéines et des lipides membranaires (Vallelian *et al.*, 2022). D'autres effets toxiques seront discutés plus en détail dans la partie 1.4.5.

1.4 L'hème

1.4.1 Structure et état de l'ion de fer

L'hème est une molécule organique macrocyclique, appartenant à la famille des métalloporphyrines. Sa structure repose sur l'interaction de quatre pyrroles ($\text{C}_4\text{H}_4\text{NH}$), reliés par quatre groupements méthyles (CH_3) et maintenant un ion de fer en son centre. Cet ion de fer peut adopter deux états d'oxydation, soit ferreux (Fe^{2+}) ou ferrique (Fe^{3+}). Dans son état ferreux, l'hème est neutre et prend le nom de ferroprotoporphyrine. En revanche, lorsque l'ion de fer est à l'état ferrique, la molécule porte une charge positive et est désignée comme la ferriprotoporphyrine (Hémine, abrégée HE) (Kumar et Bandyopadhyay, 2005). Les structures simplifiées des deux formes discutées sont représentées dans la Figure 1.

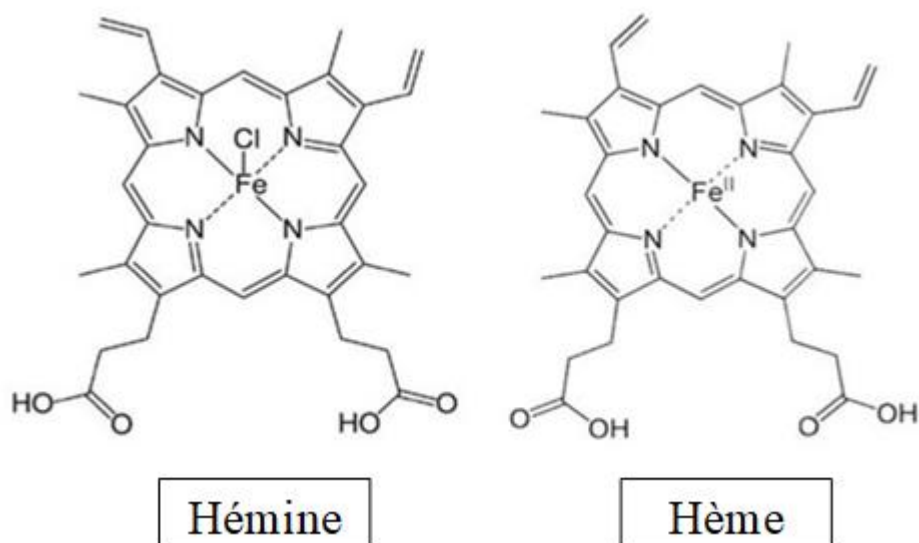


Figure 1 : Représentation moléculaire de Lewis de l'HE et de l'hème (Figure modifiée tirée de (Carrasco-Pozo *et al.*, 2020))

1.4.2 Rôles types

L'hème est un groupement prosthétique essentiel au fonctionnement des hémoprotéines. L'ion de fer contenu au centre de la protoporphyrine régule les réactions d'oxydoréduction nécessaire à diverses fonctions cellulaires. Par exemple, l'hémoglobine et la myoglobine assurent respectivement le transport et le stockage de l'oxygène. Dans les cytochromes, tels que le P450 et le cytochrome C, l'hème est impliqué dans le transport des électrons, contribuant à la production d'énergie et participant au métabolisme des xénobiotiques. L'hème fait également partie de la structure des catalases et des peroxydases, où il intervient respectivement dans l'inactivation et l'activation du peroxyde d'hydrogène (Chiabrando *et al.*, 2014 ; Ryter, 2021).

1.4.3 Rôles émergents

En plus de ces fonctions dites typiques et bien connues de l'hème, deux autres fonctions émergentes font leur apparition. D'une part, il agit comme senseur de gaz, servant de site de détection pour des gaz tels que l'O₂, le NO et le CO; cet interaction peut activer ou inhiber des domaines fonctionnels de certaines protéines, comme la phosphodiesterase, la diguanylate cyclase et la kinase histidine (Martínková *et al.*, 2013 ; Potter *et al.*, 2024 ; Shimizu *et al.*, 2015). D'autre part, l'hème intervient comme molécule de signalisation primaire, interagissant avec des motifs spécifiques (*heme binding motifs* (HBM)) présents sur

certaines protéines. L'association ou la dissociation de l'hème avec les HBM peut déclencher ou réguler des voies de signalisation cellulaire, impactant des processus tels que la transcription, la translation, l'épissage des microARNs, la phosphorylation des protéines, la dégradation des protéines et le catabolisme de l'hème (Shimizu *et al.*, 2019).

Bien que l'association entre l'hème et les HBM, ainsi que les mécanismes précis, ne soient pas encore complètement élucidés, certaines généralités semblent avoir été établies dans la littérature (Shimizu *et al.*, 2019). Notamment, les HBM ont été divisées en trois catégories de motif. La première est le motif Cys-Pro (CP), où la partie thiolate de la cystéine permet majoritairement la détection et la liaison de l'HE, tandis que la proline semble plutôt jouer le rôle de régulateur structural protéique (Igarashi *et al.*, 2008 ; Lee *et al.*, 2003 ; Shimizu *et al.*, 2019). Par exemple, le facteur de transcription Btb et Cnc homologue 1 et 2 (Bach1 et Bach2), ainsi que la p53 font partie des molécules contenant des motifs de cette catégorie (Shen *et al.*, 2014 ; Watanabe-Matsui *et al.*, 2015 ; Zenke-Kawasaki *et al.*, 2007). La deuxième catégorie est représentée par un motif cystéine isolé et sans motif CP, qui est par exemple retrouvé dans le canal Slo1 BK, ainsi que dans le canal potassium à voltage-dépendant Kv10.1 (Sahoo *et al.*, 2022 ; Tang *et al.*, 2003). Enfin, le troisième type de motif implique une histidine dans le site de liaison; les facteurs de transcription Rev-erb α et Rev-erb β contiennent des motifs de cette catégorie (Duvigneau *et al.*, 2019). Par ailleurs, la diversité des protéines capables d'interagir avec l'hème par les motifs HBM semble plus vaste que prévu, suggérant que de nombreux motifs HBM restent encore à découvrir (Shimizu *et al.*, 2019 ; Wißbrock *et al.*, 2019).

Il est devenu évident que l'hème ne se limite pas à son rôle traditionnel de groupe prosthétique au sein des hémoprotéines, mais qu'il joue également un rôle de senseur de gaz et régulateur de voie de signalisation, en interagissant, par l'intermédiaire de HBM, avec des protéines présentes à la fois dans les membranes cellulaires et dans le cytoplasme (Zenke-Kawasaki *et al.*, 2007).

1.4.4 Régulation de la concentration de l'hème libre par l'hème oxygénase

Grâce à ses rôles classiques et émergents, l'hème est essentiel à de nombreuses fonctions cellulaires. Cependant, en raison de sa nature pro-oxydante et de son impact sur diverses voies de signalisation, sa concentration intracellulaire doit être soigneusement régulée afin d'en éviter sa toxicité. L'homéostasie de l'hème est normalement préservée par une gestion équilibrée entre sa formation et sa dégradation.

La dégradation de l'hème/HE est un processus enzymatique en plusieurs étapes impliquant trois enzymes clés, et l'enzyme hème oxygénase (HO) catalyse l'étape limitante de ce processus (Duvigneau *et al.*, 2019). En association avec le cytochrome P450 réductase et en présence de NADPH ainsi que de trois molécules de dioxygène (O₂) par molécule d'hème/HE, la HO assure le clivage oxydatif de la protoporphyrine. Cette réaction entraîne la production d'une quantité équimolaire de biliverdine, de monoxyde de carbone (CO) et d'ions Fe²⁺ (Consonni *et al.*, 2024). La biliverdine est ensuite convertie en bilirubine par l'enzyme biliverdine réductase, tandis que le fer est capté par la ferritine. Cette dernière permet entre autres de stocker le fer, mais aussi prévient la formation de ROS induite par le fer libre (Imoto *et al.*, 2022). Par ailleurs, les trois molécules issues de la dégradation de l'hème/HE, soit la biliverdine, la bilirubine et le CO sont reconnues pour leurs propriétés antioxydantes, ce qui contribue à la régulation du stress oxydatif (Wu *et al.*, 2019 ; Ziberna *et al.*, 2016).

Il existe principalement deux isoformes actives de HO, soit l'HO-1 et l'HO-2, qui sont codées respectivement par les gènes *HMOX1* et *HMOX2*. Ceux-ci diffèrent par leur régulation et leur distribution tissulaire. L'HO-1 est inductible et hautement dynamique, tandis que l'HO-2 est d'expression constitutive et moins régulée (Funes *et al.*, 2020). L'expression de l'HO-1 est induite en réponse à son substrat, l'hème/HE, ainsi qu'en présence de stress environnementaux tels que les chocs thermiques, la présence de fer libre et de métaux lourds, le stress oxydatif, les cytokines pro-inflammatoires et l'hypoxie (Funes *et al.*, 2020). L'HO-2 est exprimée de manière constitutive dans la plupart des cellules, avec une expression particulièrement élevée dans les testicules, le cerveau, ainsi que dans les cellules endothéliales et musculaires lisses des vaisseaux cérébraux (Muñoz-Sánchez et Chánez-Cárdenas, 2014).

Une troisième isoforme, l'HO-3, a également été découverte par McCoubrey *et al.* (1997). Cependant, son activité enzymatique est faible et ne peut être comparée à celle des deux autres isoformes. Il a aussi été rapporté que l'HO-3 contient deux motifs HBM avec des résidus cystéine, qui se lient à l'hème/HE indépendamment du site catalytique central, suggérant que l'hème pourrait avoir un rôle régulateur dans l'expression et l'activité de l'HO-3 (Hayashi *et al.*, 2004). Son rôle et sa distribution tissulaire restent encore mal définis (Hayashi *et al.*, 2004).

L'induction de HO-1 par l'HE en condition non saturante d'activité favorise une régénération osseuse en influençant à la fois les OSBs et les OSCs, en réduisant l'inflammation, le stress oxydatif et l'apoptose des cellules dans le micro-environnement des os. Plus spécifiquement, la HO-1 favorise la différenciation des

cellules souches mésenchymateuses en OSBs fonctionnels, tout en diminuant leur différenciation en adipocytes (Zhou *et al.*, 2021b). De plus, l'induction de l'HO-1 diminue l'entrée en apoptose ou en sénescence des OSBs (Petrache *et al.*, 2000 ; Zhou *et al.*, 2021b). Cette réduction a pour effet de diminuer le phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP), lequel est connu pour favoriser la synthèse de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires, ainsi que la synthèse de RANKL par les ostéocytes et les OSBs sénescents (Chen *et al.*, 2013 ; Zhou *et al.*, 2021b).

1.4.5 Toxicité de l'HE libre

Lors de cas d'hémolyse sévère, les mécanismes physiologiques visant à réguler la concentration d'hème/HE libre dans le sang deviennent saturés, entraînant sa persistance extracellulaire. En raison de sa structure plane et de sa nature lipophile, l'hème/HE diffuse et s'intercale dans les membranes cellulaires, favorisant ainsi son accumulation intracellulaire. L'hème/HE constitue alors une source abondante de fer réactif, participant aux réactions de Fenton et de Haber–Weiss, ce qui amplifie la production de ROS tel que le radical hydroxyle ($\text{OH}\cdot$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'anion superoxyde (O_2^-) (Chiabrando *et al.*, 2014). Ces ROS sont responsables de nombreux dommages cellulaires, notamment la peroxydation des phospholipides et des protéines membranaires provoquant une altération de la fluidité et de l'intégrité des membranes cellulaires (Kozlova *et al.*, 2014 ; Solar *et al.*, 1991). De plus, ils peuvent endommager l'ADN et l'ARN en oxydant les bases azotées et le désoxyribose, augmentant ainsi le risque de mutations, de carcinogenèse, et d'induction de l'apoptose ou de la nécrose. Enfin, les ROS peuvent altérer les protéines, en oxydant certains acides aminés, en provoquant la rupture des liaisons peptidiques et en favorisant leur agrégation (Juan *et al.*, 2021 ; Kumar et Bandyopadhyay, 2005).

1.5 La santé osseuse mise à l'épreuve : liens entre l'anémie hémolytique et l'ostéoporose

L'anémie hémolytique est reconnue comme un facteur contribuant à l'altération de la santé osseuse et à un risque accru d'ostéoporose. Des études ont montré que les patients atteints d'anémie hémolytique, en particulier ceux souffrant de drépanocytose ou de thalassémie, présentent une diminution de la densité minéralisée osseuse ainsi qu'un risque accru de fractures (Lonergan *et al.*, 2001 ; Pootrakul *et al.*, 1981 ; Smith-Guzmán, 2015). Une étude ultérieure, et à plus grande échelle, a révélé que des patients atteints d'anémie hémolytique avaient un risque 1,3 fois plus élevé de développer une ostéoporose, par rapport aux individus sains (Shi *et al.*, 2021). Il a été suggéré que la pathogenèse impliquait plusieurs facteurs, notamment un stress hématopoïétique accru donnant lieu à une hyperplasie de la moelle osseuse, une

surcharge en fer, une augmentation du stress oxydatif et des déséquilibres hormonaux (Gurevitch et Slavin, 2006 ; Perisano *et al.*, 2012 ; Steer *et al.*, 2017).

Dans la revue littéraire de Gurevitch et Slavin (2006), les auteurs suggèrent qu'une perte sanguine chronique exercerait une pression sur le tissu hématopoïétique, stimulant ainsi la production de facteurs de croissance hématopoïétiques. Cette surproduction favoriserait alors la prolifération des cellules progénitrices hématopoïétiques, ce qui causerait une augmentation du nombre de cellules hématopoïétiques, comprenant les OSCs. En conséquence, la résorption osseuse s'intensifierait, augmentant les espaces trabéculaires.

Une étude menée par notre laboratoire a examiné l'impact de l'anémie hémolytique induite soit par l'infection des érythrocytes par *P. c. adami*, entraînant une hémolyse progressive, soit par un traitement à la PHZ, un agent provoquant la peroxydation des lipides membranaires érythrocytaires et une hémolyse aiguë chez la souris. De plus, les auteurs ont aussi comparé les effets de l'anémie non hémolytique, induite par une phlébotomie (saignement) modérée des souris (Moreau *et al.*, 2012). L'impact de ces trois modèles d'anémie sur le métabolisme osseux et l'érythropoïèse a ensuite été comparé. L'étude a rapporté une diminution de la densité osseuse minéralisée et des tissus osseux trabéculaires strictement dans les cas d'hémolyse. En corrélation avec ces deux facteurs, une réduction significative des marqueurs sériques de formation osseuse, comme l'OCN et le P1NP, a été observée exclusivement dans les conditions d'hémolyse. De plus, une inhibition a été observée à la fois sur le nombre de progéniteurs ostéoclastiques et sur leur capacité à fusionner en réponse au RANKL et au M-CSF, sans toutefois avoir un effet significatif sur les marqueurs sériques de résorption osseuse (Moreau *et al.*, 2012). Contrairement à l'anémie causée par saignement, l'infection par *Plasmodium* et l'administration de PHZ ont entraîné une hémolyse aiguë accompagnée de la libération accrue d'hème en circulation (Moreau *et al.*, 2012). Notre laboratoire a ensuite reproduit ces effets dans un modèle murin où les souris ont reçu des injections d'HE (10 mg/Kg poids, voie intrapéritonéale) durant trois jours consécutifs, pour une période de deux semaines (article en préparation), appuyant l'idée que l'hème/HE extracellulaire puisse altérer rapidement les tissus osseux, et ceci en absences d'anémie ou d'hypoxie. Plusieurs études ont également rapporté des effets similaires dans des conditions d'hémolyse sévères et chroniques, où l'ostéoporose se développe, entraînant une fragilité et une perte de masse osseuse (Lee *et al.*, 2017 ; Shi *et al.*, 2021 ; Smith-Guzmán, 2015). Chez la souris, il est important de noter que l'érythropoïèse de stress, qui est stimulée en réponse à une anémie modérée à sévère, s'effectue principalement dans la rate et le foie (Bennett *et al.*, 2018). La moelle osseuse,

quant à elle, est plutôt impliqué dans l'érythropoïèse homéostatique basale et a donc peu d'impact (Bennett *et al.*, 2018). Par conséquent, l'altération du métabolisme osseux observée dans ces modèles murins ne peut être complètement attribuée à l'hyperplasie de la moelle osseuse.

Ces informations suggèrent d'une part que les facteurs contribuant à la perte osseuse dans l'anémie hémolytique peuvent être différents de ceux impliqués dans l'anémie non hémolytique et, d'autre part, qu'une association entre la destruction des érythrocytes, l'hème/HE extracellulaire et les altérations du tissu osseux est à envisager.

1.6 Rôle du mouvement cellulaire dans le remodelage osseux

1.6.1 Introduction au mouvement cellulaire

Le mouvement cellulaire joue un rôle fondamental dans de nombreux processus physiologiques, développementaux et physiopathologiques. De manière générale, les cellules doivent être capables de percevoir et interpréter divers stimuli présents dans leurs environnements afin de se déplacer vers ou contre ces différents signaux. Cette capacité leur permet d'accomplir des fonctions essentielles, notamment lors de l'embryogenèse, de l'établissement d'une réponse immunitaire efficace ou encore dans le cadre de la réparation des tissus endommagés (Franz *et al.*, 2002).

Le cycle de motilité cellulaire débute par des stimuli qui déclenchent des cascades de signalisation et permettent à la cellule de se polariser, impliquant l'adoption d'une morphologie asymétrique (SenGupta *et al.*, 2021). Du côté où le mouvement prendra lieu, une protrusion est constatée, ayant deux formes distinctes, le filopode et le lamellipode. Le filopode se localise à l'extrémité de la protrusion, et se caractérise par une forme filamenteuse et mince, tandis que dans le corps de la protrusion, le lamellipode acquiert une forme large et aplatie. Ces protrusions sont le résultat d'une polymérisation contrôlée de l'actine déplaçant la membrane plasmique (vue en détail à la section 1.7). De nombreuses protéines d'adhésion sont synthétisées, véhiculées et positionnées à l'avant des protrusions en formation. Le lien entre ces protéines d'adhésion et la matrice extracellulaire donne alors naissance à des structures protéiques, nommées adhésions focales; permettant un ancrage fort à la matrice extracellulaire (Ridley *et al.*, 2003). Ces adhésions focales se connectent à la machinerie de l'actomyosine (ou filament de stress) et exercent une action sur les adhésions focales et déclenchent l'avancée de la cellule (Seetharaman et Etienne-Manneville, 2020). Du côté inverse de la protrusion, à l'arrière de la cellule, une extension en forme de queue est régulièrement observée, appelée l'uropode (Sánchez-Madrid et Serrador, 2009). À

l'avancée de la cellule, l'actine dans l'uropode se dépolymérise, les protéines d'adhésion sont endocytées et l'arrière se rétracte. Les protéines d'adhésion progressent alors rapidement vers les endosomes tardifs et retournent dans les protrusions à l'avant de la cellule (Petrie *et al.*, 2009 ; Ridley *et al.*, 2003).

Le cycle de motilité cellulaire est influencé par plusieurs facteurs tels que le type cellulaire, la présence de signaux solubles comme les chimioattractants et les chimiorépulsifs, ainsi que les propriétés physiques et biochimiques de la matrice extracellulaire (Seetharaman et Etienne-Manneville, 2020 ; Thiel *et al.*, 2018). Comme mentionné plus tôt, le cycle de motilité cellulaire est activé lorsque des signaux de migration cellulaire atteignent les récepteurs membranaires de la cellule. Deux types de migration peuvent être identifiés chez les OSBs matures. L'un est la chimiokinèse, une migration cellulaire aléatoire et non directionnelle, et déclenchée par une concentration uniforme de ligands. L'autre est le chimiotactisme, une migration cellulaire directionnelle, engendrée par un gradient de chimioattractants (Thiel *et al.*, 2018).

Il existe différents types de mouvement cellulaire, dont le mouvement amiboïde et le mouvement mésenchymateux; tous deux sont influencés par la morphologie cellulaire, les types d'adhésines et le dynamisme du cytosquelette (Seetharaman et Etienne-Manneville, 2020). Le mouvement amiboïde est caractérisé par des actions irrégulières, des changements de forme rapides et une faible adhérence à la matrice extracellulaire (Seetharaman et Etienne-Manneville, 2020 ; SenGupta *et al.*, 2021). De plus, le mouvement amiboïde est associé à une création et une rétraction rapide des protrusions. Ceci s'explique en grande partie par le manque d'adhésions focales matures et/ou de fibres de stress. Le mouvement type mésenchymateux, pour sa part, est coordonné et directionnel, et l'adhésion à la matrice extracellulaire implique l'action des intégrines formant des adhésions focales matures. Cette adhésion de forte intensité diminue la vitesse des mouvements et donc de la migration entière (Seetharaman et Etienne-Manneville, 2020). Bien que ce texte se soit concentré sur deux types de migration et de mouvement, d'autres formes ont été identifiées et recensées par SenGupta *et al.* (2021).

1.6.2 La migration cellulaire et son importance dans le remodelage osseux

La migration cellulaire est essentielle pour une myriade de processus physiologiques, et ceci est d'autant plus vrai lors du remodelage osseux : les OSBs nécessairement se déplacent pour combler les cavités de résorption créées par les OSCs et assurent ainsi le maintien de l'intégrité osseuse (Nakahama, 2010).

Comme mentionné précédemment, le cycle du remodelage osseux est initié en réponse à des stimuli spécifiques qui, dans la plupart des cas, mènent à l'apoptose des ostéocytes. Ceci permet la libération de facteurs d'ostéoclastogenèse, tels que le M-CSF et le RANKL, ce qui favorise le recrutement des précurseurs des OSCs de la moelle osseuse (Allen et Burr, 2019). Dans une étude *in vivo*, Kennedy *et al.* (2012) ont démontré que la concentration de RANKL dans le tissu osseux était plus forte dans une zone située autour de 150 à 200 μm des ostéocytes apoptotiques, et que la quantité d'OSCs matures concordait avec cette hausse de concentration. Ceci suggère que le RANKL promeut le recrutement et l'invasion des précurseurs ostéoclastique de la moelle osseuse vers le BRC.

La dégradation de la matrice osseuse par les OSCs permet aussi la libération de plusieurs facteurs enfouis, par les OSBs, dans la partie organique de la matrice osseuse. Deux facteurs sont bien connus pour le recrutement des OSBs, soit le TGF- β 1 et l'IGF-1, qui permettent, entre autres, la migration des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse vers le BRC, mais aussi régulent la motilité des OSBs à l'intérieur du BRC (Bolamperti *et al.*, 2022). Les effets de ces facteurs solubles et d'autres molécules chimiotactiques sur la motilité et sur le recrutement cellulaire ont été testés par des essais de transwell (Système de chambre transmembranaire de Boyden), et sont discutés dans la revue littéraire de Thiel *et al.* (2018).

Le potentiel migratoire des lignées ostéoblastiques avait déjà été décrite par Jones et Boyde en 1977. Ces auteurs avaient utilisé la microscopie électronique afin de détecter la migration d'OSBs provenant d'un explant d'os plat. Leurs observations ont mené à quatre conclusions importantes : (1) Les OSBs migrent sur les os; (2) Les OSBs peuvent migrer seuls ou en groupes interreliés; (3) Lors de leur migration, les OSBs ont une forme allongée et (4) Les OSBs migrent le long de fibrilles de collagènes.

En 2014, dans un modèle *in vivo* du zebrafish *Daniorerio*, l'équipe de Geurtzen *et al.* a démontré que les OSBs migrent vers une fracture fraîchement faite dès les premiers jours des dommages, mais aussi que cette migration est due à un recrutement plutôt qu'une prolifération cellulaire. Enfin la migration des OSBs au cours de la déposition de la matrice osseuse est étroitement liée à leur incorporation dans l'ostéoïde, un processus essentiel à leur différenciation en ostéocytes. Selon la revue littéraire de Dallas et Bonewald (2010), ce phénomène doit implicitement impliquer une réduction progressive de la motilité des OSBs, parallèlement à une augmentation ou un maintien de la motilité des cellules environnantes responsables de leur enfouissement dans la matrice en formation. Ceci semble être en accord avec la recherche de

Shirakawa *et al.* (2014), où le cycle cellulaire des OSBs, leur vitesse de migration et leur différenciation ont été étudiés. Ils ont démontré que le cycle cellulaire des OSBs est lié à leur capacité de renouvellement et de différenciation, que les OSBs en phases S/G2/M du cycle cellulaire migrent plus rapidement que ceux en phase G1, et que la combinaison du PTH et du stress mécanique permettent la transition entre la phase G1 et les autres phases. Avec ces évidences, la migration cellulaire est sans aucun doute une fonction cruciale pour les cellules osseuses, mais aussi est essentielle pour une homéostasie osseuse équilibrée et un remodelage osseux sain.

1.7 Le cytosquelette et son rôle dans la migration cellulaire

Comme préalablement discutée, la migration est un processus hautement dynamique orchestré par le cytosquelette, qui est composé de trois catégories de filaments: les microtubules, les filaments intermédiaires et les filaments d'actine (F-actine). Les microtubules forment un réseau polarisé permettant le mouvement des organites et des protéines intracellulaires (Seetharaman et Etienne-Manneville, 2020). Les filaments intermédiaires pour leur part ont le rôle d'être les filaments les plus rigides et permettent d'établir une structure et une forme à la cellule. Les F-actine sont en grande partie responsables des protrusions et de la force de contraction lors de la migration cellulaire. Ces trois catégories de filaments travaillent ensemble et parviennent à coordonner une migration efficace (Seetharaman et Etienne-Manneville, 2020).

Parmi les différents composants du cytosquelette, la F-actine a été sélectionnée pour cette étude en raison de son rôle central dans la régulation de divers processus cellulaires, notamment la migration cellulaire et la fusion des macrophages (Wang *et al.*, 2015). La F-actine intervient dans plusieurs autres mécanismes fondamentaux, tels que la division cellulaire, le maintien de la structure cellulaire et la signalisation intracellulaire (Pollard et Cooper, 2009 ; Tang et Gerlach, 2017). De plus, en termes de masse, la F-actine constitue l'élément structural principal des protrusions cellulaires, ce qui fait d'elle une structure protéique d'intérêt en recherche sur la migration cellulaire.

1.7.1 La F-actine : élément essentiel dans la poussée membranaire et la formation des protrusions

Lors de la formation d'une protrusion, la cellule doit exercer une force de poussée sur la membrane plasmique. Pour ce faire, elle exploite l'énergie générée par la polymérisation des G-actine en F-actine. La force de poussée générée par la polymérisation de l'actine est déterminée par la polarité intrinsèque des filaments en construction. En effet, les filaments forçant la membrane plasmique à s'étendre possèdent

deux extrémités distinctes. La première est nommée l'extrémité barbelée (ou l'extrémité positive (+)) et est caractérisée par une addition préférentielle et rapide en G-actine. La seconde extrémité est nommée pointue (ou extrémité négative (-)) et est caractérisée par une polymérisation plus lente ou encore une dépolymérisation. Cette organisation asymétrique de la F-actine permet une croissance directionnelle à la formation des deux types de protrusions (Pollard, 2016).

La voie typique et générale de la croissance de la F-actine est intrinsèquement reliée à l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP). À la suite de sa traduction et sa maturation, la G-actine s'associe rapidement et fortement à l'ATP. La G-actine-ATP est alors ajoutée à l'extrémité (+) du filament, puis à l'intérieur du filament l'ATP s'hydrolyse donnant lieu à une G-actine-ADP. La stabilité de la G-actine-ADP est alors moindre et elle se dissocie à l'extrémité (-). Cependant, ce type de croissance dite spontanée n'est pas rapide et ne rend pas à sa juste valeur toute la complexité du dynamisme de l'actine (Svitkina, 2018).

Le dynamisme de la F-actine peut être modulé par un grand nombre de protéines se liant directement à l'une ou l'autre de ces formes. Cette famille de protéines est nommée les protéines liant l'actine (ou ABP de l'anglais *actin binding proteins*) et permet d'assurer la disponibilité d'un réservoir de G-actine pour la polymérisation, l'assemblage de nouveaux filaments, l'élongation de filaments, la régulation de la croissance des filaments en coiffant les extrémités barbelées ou pointues, la fragmentation des filaments existants ainsi que leur réticulation (Pollard, 2016). Une liste succincte des principales protéines accessoires impliquées dans cette dynamique est présentée dans le Tableau I.

Tableau I : Liste non exhaustive des protéines liant l'actine (ABP) dont la fonction principale est de réguler la polymérisation de l'actine

Protéines accessoires	Fonctions dans l'assemblage des F-actine	REF.
Formine	Nucléation et assemblage des F-actine linéaires restant associés à l'extrémité (+).	(Courtemanche, 2018)
Thymosine	Séquestre les G-actine empêchant son assemblage en F-actine et favorise leur stockage dans le cytoplasme.	(Goldstein <i>et al.</i> , 2005)
Tropomoduline	Régule la longueur des F-actines en bloquant l'ajout et la perte de G-actine à l'extrémité (-).	(Kostyukova <i>et al.</i> , 2006)
Cofiline	Cause la dépolymérisation des F-actine en se liant aux extrémités et en favorisant leur dissociation en G-actine.	(Bravo-Cordero <i>et al.</i> , 2013 ; Wioland <i>et al.</i> , 2017)
Gelsoline	Fragmente les F-actines en filaments plus courts et se lie aux extrémités (+).	(Heidings <i>et al.</i> , 2020)
Protéines coiffages	Régule la longueur des F-actine en bloquant l'ajout ou la perte de G-actine à l'extrémité (+).	(Edwards <i>et al.</i> , 2014)
Tropomyosine	Stabilise la F-actine en se liant tout au long. Régule l'interaction entre l'actine et la myosine.	(Hitchcock-DeGregori <i>et al.</i> , 2002)
Spectrine	Tapisse la partie cytosolique de la membrane plasmique. Maintien la stabilité structurale de la membrane cellulaire.	(Zhang <i>et al.</i> , 2013)
Profiline	Stimule l'assemblage des F-actine en se liant aux G-actine et favorise l'échange entre l'ADP et l'ATP.	(Krishnan et Moens, 2009)
Plastine-3 (PLS3)	Permet de lier et de regrouper les F-actine.	(Delanote <i>et al.</i> , 2005)
Actin-related protein 2/3 (Arp2/3)	Participe à la nucléation et aux embranchements des F-actine en se liant aux F-actine existants et en facilitant l'assemblage des nouveaux filaments sous un angle de 70°.	(Dyche Mullins et Pollard, 1999)
Protéine Wiskott Aldrich (WASP)	Régule la nucléation des F-actine, ainsi que la formation de structures en réseau en se liant à l'Arp2/3 et aux F-actine existants.	(Rodnick-Smith <i>et al.</i> , 2016)

L'activité des ABPs et la dynamique de l'actine sont principalement régulées par des cascades de signalisation impliquant les facteurs d'échange de guanine (GEF) et les guanosines-triphosphates homologues à Ras (Rho-GTPases). La Figure 2 répertorie les principaux intervenants, leurs effecteurs et les fonctions cellulaires qui leur sont associées. Brièvement, les GEFs activent les Rho-GTPase en catalysant l'échange de la GDP contre de la GTP, ce qui occasionne un changement de conformation de la GTPase découvrant la région liant les effecteurs. Chaque type de GTPase déclenche une cascade de signalisation spécifique, activant ou inhibant certaines ABPs, ce qui module la dynamique de l'actine et influence diverses fonctions cellulaires (Hanna et El-Sibai, 2013). Une fois leurs effecteurs activés, la GTP est hydrolysée en GDP remettant la GTPase sous sa forme inactive.

Deux revues ont particulièrement bien recensé ces voies de signalisation, mais aussi les différentes fonctions cellulaires leur étant associées. De plus, elles mettent en lumière certaines pathologies associées à la dysfonction des GEFs et Rho-GTPase (Hanna et El-Sibai, 2013 ; Thompson *et al.*, 2021). En raison de son implication dans les fonctions des OSCs, le GEF DOCK5 a été particulièrement intéressant dans les études. En effet, Vives *et al.* (2011) ont démontré que DOCK5 est essentiel à la formation de la zone étanche entre la membrane plasmique des OSCs et la matrice osseuse. Pour approfondir cette observation, les auteurs ont étudié l'effet d'un knock-out de DOCK5 chez la souris (*Dock5*^{-/-}). Ils ont ainsi constaté que les souris *Dock5*^{-/-} présentaient une augmentation de la masse osseuse trabéculaire, sans diminution du nombre d'OSCs. Ils ont alors suggéré que DOCK5 est indispensable à la résorption osseuse, mais n'est pas impliqué dans la différenciation des OSCs.

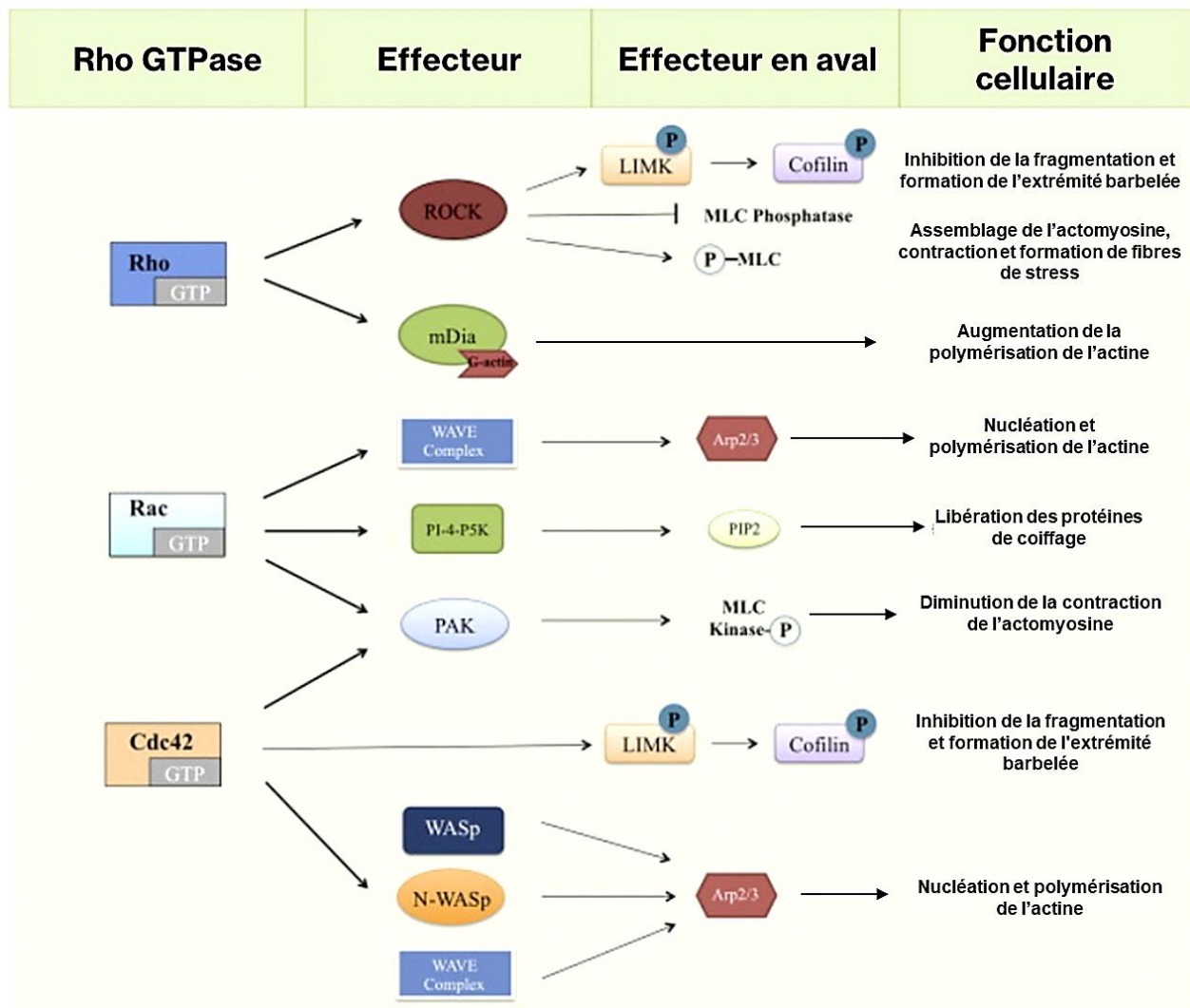


Figure 2 : Cascade de signalisation de trois Rho GTPase (Rho, Rac, Cdc42) menant à leurs fonctions clefs et mettant en évidence leurs effecteurs principaux en aval.

La GTPase Rho active la kinase à domaine enroulé en hélice associée à Rho (ROCK) et l'effecteur homologue mammalien de Diaphanous (mDia). Cette dernière permet l'augmentation de la polymérisation de l'actine. De son côté, ROCK permet la phosphorylation et l'activation de la kinase LIM (LIMK), qui à son tour phosphoryle la cofiline, la désactivant et diminuant ainsi la fragmentation des F-actine; il augmente la formation des extrémités barbelées dans les protrusions. ROCK phosphoryle aussi la chaîne légère de la myosine (MLC) et inhibe la sous-unité de liaison à la myosine (MBS), provoquant l'assemblage de l'actomyosine, ainsi que la formation et la contraction des fibres de stress. Les GTPase Rac et Cdc42 activent le complexe Wiskott-Aldrich syndrome protein family member (WAVE, WASp et N-WASp), ce qui permet l'action d'Arp2/3. Ces deux GTPase permettent aussi d'activer la kinase activée p21 (PAK). À son tour, PAK phosphoryle et inactive la kinase MLC, inhibant ainsi la contraction de l'actomyosine. Rac active aussi la voie PIP2 ce qui permet la libération des protéines de coiffage. Semblable à la GTPase Rho, Rac active LIMK et inactive la cofiline (Figure modifiée, tirée de : Hanna et El-Sibai, 2013).

1.7.2 Impact de l'HE sur le réseau d'actine

Depuis plusieurs décennies, les recherches ont exploré l'impact potentiel de l'hème/HE sur la dynamique de l'actine et des membranes cellulaires. En 1984, Avissar *et al.* ont utilisé une approche biochimique par reconstitution *in vitro* et ont démontré une forte interaction entre l'hème et l'actine purifiée à partir de cellules musculaires squelettiques de lapin ($K_a = 5,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$). L'association G-actine-HE diminuait aussi la polymérisation en F-actine. Néanmoins, ce type d'exploration, bien que rigoureux et précis, reste limité dans sa capacité à révéler les effets fonctionnels potentiels de l'interaction entre l'HE et l'actine.

Un an plus tard, Liu *et al.* (1985) ont étudié les effets de l'HE sur la membrane cellulaire et le cytosquelette des érythrocytes. Leur analyse a révélé que l'HE induit des modifications de la conformation de la spectrine et de la protéine 4.1. Ces modifications peuvent contribuer à la stabilisation de ces protéines augmentant la rigidité de la membrane cellulaire des érythrocytes (Jarolim *et al.*, 1990 ; Shaklai *et al.*, 1985, 1986). La hausse de la rigidité a été associée à un *pontage* du cytosquelette membranaire, conséquence d'une augmentation en H_2O_2 intracellulaire par l'HE (Jarolim *et al.*, 1990 ; Shaklai *et al.*, 1985, 1986). En 1987, Shaklai *et al.* ont démontré que l' H_2O_2 occasionne une oxydation de certains résidus, tels que le tryptophane, la tyrosine, la lysine et l'histidine, ce qui occasionnait un changement de conformation. L'équipe de Solar *et al.* en 1990 a apporté l'évidence qu'en présence d' H_2O_2 l'hème/HE interagit rapidement et de manière covalente avec la protéine 4.1 et la spectrine, par l'intermédiaire de la tyrosine. Ces évidences suggèrent que l'HE cause des effets directs et rapides sur le cytosquelette. Néanmoins, l'impact de l'HE ne semble pas se limiter qu'à ces trois protéines.

Plus récemment, l'HE a été associée à une diminution de la phagocytose et de la migration des macrophages RAW264.7. Martins *et al.* (2016) ont démontré que l'HE perturbe la dynamique de l'actine en induisant une suractivation de la GTPase Cdc42, cette dernière étant suractivée par le GEF DOCK8. L'équipe a d'ailleurs émis l'hypothèse que l'HE pourrait stimuler l'activité de DOCK8 soit en interagissant directement ou indirectement avec celui-ci. Un phénomène similaire a été reporté avec la lignée cellulaire LM3, qui est issue d'un adénocarcinome mammaire murin (Coló *et al.*, 2023). Dans cette étude, les auteurs ont démontré qu'un traitement à l'HE occasionnait un changement dans la distribution des F-actine des cellules LM3. Plus précisément, les cellules témoins présentaient davantage de F-actine ventraux et dorsaux, tandis que les cellules traitées à l'HE avaient une perte de F-actine ventrale et une augmentation de F-actine corticale. Ils ont alors associé cette réorganisation de F-actine à une diminution du GEF Arhgef2, qui est activateur de la RhoA-GTPase (Coló *et al.*, 2023). Les résultats de Coló *et al.*, ainsi que ceux de

Martins et al. sont particulièrement intrigants, car dans les cellules RAW264.7 traitées à l'HE, un grand nombre de filopodes en développement a été observé, tandis que dans les cellules LM3, aucun changement dans le nombre de protrusions en développement n'a été rapporté. Ces observations suggèrent que l'HE pourrait induire des effets distincts selon le type cellulaire.

1.8 La Cofiline

La cofiline est une protéine essentielle dans la régulation de la dynamique de l'actine. Cette ABP se lie à la F-actine et provoque sa dépolymérisation, permettant aux molécules de G-actine d'être réutilisées pour la croissance des nouveaux filaments (Yeoh *et al.*, 2002). La cofiline est impliquée dans plusieurs fonctions cellulaires, dont la division cellulaire, la phagocytose, l'endocytose et la migration cellulaire (Bamburg, 1999 ; Bravo-Cordero *et al.*, 2013 ; Samstag *et al.*, 2013).

1.8.1 Structure, fonction et régulation de la cofiline

La cofiline est une protéine de 166 AA, avec une masse moléculaire de 18,5 kDa, et possédant une séquence de localisation nucléaire (NLS), lui permettant d'acheminer la G-actine au noyau (Abe *et al.*, 1993). Le complexe formé entre la cofiline et la G-actine se lie à l'importine 9, ce qui permet son importation à travers les pores nucléaires. Une fois dans le noyau, l'actine semble exercer plusieurs fonctions importantes (Kelsch et Tootle, 2018). Elle participerait à la régulation de l'activité des ARN polymérases, serait impliquée dans certains complexes de remodelage de la chromatine, contribuerait au maintien de la structure et de l'intégrité nucléaire, interviendrait dans la régulation de certains facteurs de transcription, et pourrait inhiber l'activité des histones désacétylases (Kelsch et Tootle, 2018).

La cofiline contient quatre résidus cystéines susceptibles d'être oxydés en présence de ROS, et cette oxydation favorise la formation de ponts disulfures (C39 et C80; C139 et C147), ce qui entraîne la perte d'affinité pour l'actine. Une fois ces quatre résidus oxydés, la cofiline est relocalisée vers la mitochondrie, où elle interagit et ouvre les pores de transition de perméabilité mitochondriale. Cette interaction induit un gonflement mitochondrial, dissipe le potentiel membranaire et libère les cytochrome C, déclenchant ainsi l'apoptose de manière indépendante de l'activation des protéines Bax et Bak (Klamt *et al.*, 2009).

Les mécanismes de régulation de la cofiline ont été largement révisés ces dernières années (Bamburg *et al.*, 2021 ; Tanaka *et al.*, 2018). La régulation de la cofiline est particulièrement complexe, et repose sur son interaction avec les phosphatidylinositol-phosphates (PI(4,5)P₂ ou PIPs) et sur des modifications post-

traductionnelles (Bamburg *et al.*, 2021). Dans le premier type de régulation, la cofiline se lie fortement aux PIPs, sans toutefois interagir avec le groupement inositol de l'IP₃, et cette interaction favorise son stockage à proximité de la membrane plasmique, notamment dans la région corticale, sans influencer l'hydrolyse de l'IP₃ (Zhao *et al.*, 2010). Ce mode de régulation reste encore partiellement compris. Néanmoins, en réponse à un signal chimiotactique tel que l'EGF, l'activité du phospholipase C (PLC) entraîne l'hydrolyse du PIP, provoquant ainsi la libération de la cofiline, étant ensuite en mesure de dépolymériser les F-actine proches de la membrane plasmique (Zhao *et al.*, 2010).

Concernant le deuxième type de régulation, plusieurs modifications post-traductionnelles de la cofiline ont été décrites, la plus importante étant son inhibition par phosphorylation de sa sérine 3 (Ser3). Cette phosphorylation est principalement médiée par la kinase LIMK, elle-même activée par les GTPases Rho et Cdc42, comme illustré dans la Figure 2 (Bamburg *et al.*, 2021 ; Hanna et El-Sibai, 2013). En plus de LIMK, la kinase testiculaire (TESK) ainsi que la kinase apparentée à NIK et la kinase embryonnaire spécifique de type NIK (NRK/NESK) sont également capables de catalyser la phosphorylation de la Ser3 de la cofiline (Nakano *et al.*, 2003 ; Toshima *et al.*, 2001). À l'inverse, la déphosphorylation de la cofiline, et donc, son activation, est catalysée par les phosphatases chronophin (CIN) et la slingshot (SSH) (Bamburg *et al.*, 2021).

1.8.2 Les effets de l'HE sur la cofiline

Selon l'étude par Sayeed *et al.* 2017, l'HE peut stimuler l'expression de la cofiline dans les cellules microgliales, et inhibe ainsi leur migration (Sayeed *et al.*, 2017); cependant, dans cette étude, la régulation post-transcriptionnelle de la cofiline par phosphorylation n'a pas été abordée. Une autre étude indépendante a reporté qu'une hausse d'expression de la cofiline conduit à une augmentation de l'expression des protrusions, suivie par une augmentation de la migration cellulaire (Popow-Woźniak *et al.*, 2012). Dans le contexte de notre sujet d'étude, cet effet pourrait favoriser la formation osseuse, permettant une migration des OSBs vers le BRC. Réciproquement, les auteurs de la même étude ont argumenté qu'une hausse de la forme inactive de la cofiline pourrait conduire à une formation déficiente de F-actine et à l'inhibition de la migration cellulaire (Popow-Woźniak *et al.*, 2012), pouvant potentiellement compromettre la formation d'ostéoïdes par les OSBs. Il est clair qu'une activité excessive ou insuffisante de la cofiline inhiberait les protrusions membranaires nécessaires à la motilité et à la chimiotaxie (Popow-Woźniak *et al.*, 2012). Dans leur ensemble, ces données suggèrent qu'une régulation stricte et équilibrée de l'activité de la cofiline est essentielle pour maintenir des processus cellulaires appropriés et favoriser les fonctions cellulaires normales.

Comme mentionné auparavant, l'hème/HE possède une affinité particulière pour les motifs contenant des cystéines (Segawa *et al.*, 2022). La cofiline présente quatre résidus cystéines exposés à sa surface (Bamburg *et al.*, 2021), qui pourraient potentiellement interagir avec l'HE de manière similaire à ses interactions avec les HBM, affectant ainsi l'activité de la cofiline. Dans un autre ordre d'idée, l'HE pourrait également induire la production de ROS et augmenter l'oxydation des résidus de cystéine présents sur la cofiline créant des liens disulfures, induisant ainsi l'apoptose par les mécanismes discutés plus haut (Kaushik *et al.*, 2021 ; Samstag *et al.*, 2013 ; Tanaka *et al.*, 2018).

1.9 Hypothèse et objectifs

La présence d'hème/HE extracellulaire est une caractéristique des pathologies hémolytiques, telles que le paludisme et la thalassémie. Des travaux antérieurs de Moreau *et al.* (2012) ont montré qu'une hémolyse aiguë chez des souris BALB/c, causée par l'infection à *Plasmodium* ou par un agent chimique hémolytique, réduit rapidement et significativement la densité osseuse. Cette perte rapide de masse osseuse a ensuite été reproduite en administrant de l'HE à des souris BALB/c, à des doses atteignant des concentrations plasmatiques comparables à celles constatées dans les conditions hémolytiques évaluées en 2012. Cette diminution de la masse osseuse a été accompagnée d'une baisse des marqueurs sériques de formation osseuse (OCN et P1NP) et de différenciation ostéoclastique (TRAP5b), ainsi que d'une réduction du nombre et de la fusion des progéniteurs ostéoclastiques. Ces résultats suggèrent que l'HE altère la résorption ainsi que la formation osseuse. De plus, des résultats *in vitro* récents du laboratoire indiquent que l'HE affecte la migration des OSBs, la formation des OSCs et la fusion des macrophages. Le laboratoire a aussi mis en évidence l'intercalation de l'HE dans les membranes cellulaires des OSBs en utilisant la technique de FRAP (Résultats non publiés). Dans cette perspective, nous avons ciblé la caractérisation de l'impact de l'HE sur la fluidité de la membrane plasmique, ainsi que la dynamique de l'actine, tous deux étant des processus essentiels pour la migration, la fusion et l'adhésion cellulaire.

En considérant les connaissances actuelles et les résultats récents et non publiés de notre laboratoire, nous avons émis l'hypothèse que l'HE affecte la migration cellulaire des OSBs d'une part, en réduisant la fluidité membranaire par son intercalation dans la membrane plasmique et d'autre part, en affectant la dynamique de polarisation/dépolarisation de l'actine, ce qui pourrait potentiellement impliquer des effets sur la cofiline.

Afin de vérifier l'hypothèse, les objectifs suivants ont été ciblés :

1. Évaluer l'impact possible de la rigidité membranaire sur le retardement de la migration des MG63 conditionnées avec de l'HE. Afin d'évaluer cet objectif, nous avons effectué un test de migration par éraflure dans la monocouche cellulaire de cellules ostéoblastiques MG63 traitées avec 5, 10, 20 μM d'HE. Ce test visait à confirmer les résultats préliminaires non publiés du laboratoire, qui suggéreraient une inhibition de la migration cellulaire à 15 et 23 μM d'HE. Parallèlement, la fluidité de la membrane plasmique a été évaluée par la technique de récupération de la fluorescence après photoblanchiment (FRAP), afin de déterminer si la rigidification membranaire pourrait expliquer la diminution de la vitesse de migration. Selon notre hypothèse, l'intercalation de l'HE dans la membrane entraînerait une augmentation de la rigidité membranaire, laquelle surviendrait simultanément à la réduction de la vitesse de migration des cellules.
2. Évaluer l'impact de l'HE sur l'organisation et la dynamique de l'actine des MG63. Cet objectif a été abordé par microscopie confocale à l'aide d'une acquisition en empilement de plans Z, ainsi qu'en cytofluorométrie combinée à un double marquage fluorescent simultané de la G-actine et de la F-actine respectivement par la DNase I et la phalloïdine. Ces approches nous ont permis de suivre les effets possibles du traitement d'une heure d'HE (5, 10, 20 μM) sur l'organisation de l'actine, tout en quantifiant séparément la G-actine et la F-actine. Selon notre hypothèse, l'HE perturberait la dynamique de l'actine en réduisant la formation des F-actine, nécessaire à la formation et l'élongation des protrusions membranaires, ce qui contribuerait à l'inhibition de la vitesse de migration des MG63.
3. Évaluer l'impact de l'HE sur l'expression protéique totale de la cofiline et sur l'équilibre entre ses formes actives (non phosphorylées) et inactives (phosphorylées). L'expression totale et la forme phosphorylée de la cofiline seraient mesurées par immunobuvardage, afin d'évaluer si l'HE altère sa régulation post-traductionnelle. Selon notre hypothèse, nous nous attendons à ce que l'HE déséquilibre le rapport entre les formes active et inactive de la cofiline, en favorisant sa forme active, ce qui mènerait à une augmentation de la dépolymérisation de l'actine.

CHAPITRE 2

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Culture cellulaire et traitement

La lignée cellulaire de l'ostéosarcome humain MG-63 (ATCC CRL-1427TM) a été utilisée dans la plupart de nos expériences. Les cellules ont été cultivées dans un milieu à faible teneur en glucose *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM; Wisent Inc., Cat# 319-010-CL, CA). Le milieu a été supplémenté avec : 10% de sérum de veau fœtal inactivé (SVF), 1% de Pénicilline-Streptomycine (P/S) et des acides aminés non essentiels (GibcoTM, Cat# 11140050, É. -U.). Les cellules ont été maintenues à une température de 37°C, dans un environnement humidifié à 5% de CO₂. Une solution de Trypsine-EDTA (Sigma-Aldrich, Cat# T4049, É. -U.) a été utilisée pour décoller les cellules lors des différents passages.

Les cellules ont été soumises à différents traitements, notamment un groupe témoin sans ajout d'HE, ainsi que des groupes traités avec des concentrations d'HE allant de 5 à 23 µM. Les concentrations ont été estimées en considérant les niveaux d'hémoglobine et d'HE retrouvés libres dans le plasma lors d'hémolyse intravasculaire (Arruda *et al.*, 2004 ; Reiter *et al.*, 2002 ; Schaer *et al.*, 2013).

2.2 Préparation de l'HE

Une solution stock d'HE à 3,83 mM (De source porcine, Sigma-Aldrich, Cat# 51280, CA) été préparée dans une solution de triéthanolamine à 30%, stérilisée par chauffage à 65°C pendant 30 minutes, puis diluée dans une solution de travail de triéthanolamine à 0,3% afin de minimiser toute toxicité associée à la triéthanolamine.

2.3 Test de migration par éraflure dans la monocouche cellulaire.

Les cellules MG63 ont étéensemencées dans une plaque de 24 puits, à une densité de 5 x 10⁴ cellules par puits, dans un milieu de culture complet. Lorsque la confluence a atteint 90%, une éraflure a été réalisée dans la monocouche cellulaire à l'aide d'un embout de pipette stérile de 200 µL, créant ainsi un espace dépourvu de cellules au centre du puits. Après trois lavages au PBS, qui ont permis d'éliminer les cellules détachées, les puits ont été remplis avec du milieu DMEM complet, et les cellules ont été traitées avec 0, 5, 10 ou 20 µM d'HE. La migration cellulaire a été suivie par microscopie confocale inversée (Nikon A1, Nikon Instruments Inc., É. -U.) avec le mode *live cell imaging* (photographies accélérées d'une image par

15 minutes), sous des conditions contrôlées à une température de 37°C, d'humidité et de concentration en CO₂ de 5%, afin d'en maintenir un environnement optimal pour les cellules. Le suivi de la migration a été effectué sur une période de 18 heures, un intervalle qui a été choisi sur la base du temps de dédoublement des cellules MG63, qui est entre 28 et 38 heures (Heremans *et al.*, 1978 ; Su *et al.*, 2009). Cette durée permet de minimiser l'influence de la prolifération cellulaire sur la fermeture de l'éraflure. De plus, le suivi par photographies accélérées réalisées tout au long de l'expérience a confirmé que la fermeture de la plaie résultait d'une véritable migration cellulaire, sans présence notable de mitoses. L'acquisition et l'analyse des images ont été effectuées à l'aide du logiciel NIS-Elements AR (Nikon Instruments Inc., version 4.00.12, É. -U.). L'analyse de la fermeture de l'espace a été réalisée en quantifiant la surface restante de l'éraflure au fil du temps, permettant d'évaluer la capacité migratoire des cellules en réponse aux traitements d'HE.

2.4 Récupération de la fluorescence après photoblanchiment (FRAP)

Les cellules MG63 ont étéensemencées sur des lames Ibidi (ibidi USA, Inc. Cat# 80826, É. -U.). Une fois adhérees, elles ont été traitées avec 20 µM d'HE pendant 1, 5 et 16 heures, puis lavées trois fois avec du HBSS (1X ; Wisent Inc., Cat# 311-513-CL, CA). Ensuite, les cellules ont été marquées avec le colorant membranaire CellMask™ Deep Red (Invitrogen™, Cat# C10046, É. -U.), selon les instructions du fabricant. Les lames ont été analysées avec un microscope confocal inversé (Nikon A1+, Nikon Instruments Inc., É. -U.), équipé d'un objectif Plan Apo λ 60x. L'acquisition des images a été réalisée avec le logiciel NIS-Elements AR (version 4.00.12). L'excitation et l'émission du fluorophore ont été effectuées respectivement à 649 nm et 666 nm. Une région d'intérêt (ROI) de la membrane cellulaire a été définie pour le photoblanchiment. Le protocole FRAP a été divisé en trois phases distinctes :

- 1) Phase d'acquisition pré-photoblanchiment : Débutant avec 8 secondes d'acquisition et une prise d'image par seconde.
- 2) Phase de photoblanchiment : 5 secondes au totale, incluant une exposition au laser 403 nm à 100 % de puissance à 2,5 secondes, avec une prise d'image au début et à la fin.
- 3) Phase de récupération post-photoblanchiment : 90 secondes avec une prise d'image toutes les 7,5 secondes.

Enfin, le temps de demi-récupération ($T_{1/2}$) a été mesuré à l'aide du logiciel NIS-Elements AR (version 4.00.12), en utilisant l'option <Time Measurement -> FRAP>.

2.5 Marquage par sonde fluorescente de l'actine

2.5.1 Analyse par confocale

Des lamelles de verre ont été stérilisées sous un rayonnement ultraviolet (UV) durant un minimum de 20 minutes. Les cellules ont ensuite étéensemencées sur ces lamelles ayant été préalablement placées dans chaque puits d'une plaque de culture. Une fois les cellules ayant adhéré à la lamelle, elles ont été soumises à différents traitements, notamment un groupe témoin sans ajout d'HE, ainsi que des groupes traités avec des concentrations d'HE allant de 5 à 20 μ M. Les traitements ont été d'une durée de 1 heure. Les cellules ont ensuite été lavées au PBS (1x, pH 7,4, Wisent inc. Cat# 311-010-CL, CA), puis fixées au paraformaldéhyde 4% pendant 20 minutes à température ambiante, suivie d'une perméabilisation de 5 minutes dans une solution de PBS 1x contenant du Triton X-100 0,1%.

Par la suite, afin d'éviter une liaison non spécifique de la DNase 1 et de la phalloïdine, les sites non spécifiques ont été bloqués avec une solution de blocage (PBS 1x, 1% BSA) durant 30 minutes à température ambiante. Les échantillons ont été par la suite lavés avec du PBS 1x (3 fois, 5 minutes par lavage). Les deux colorations ont été faites de manière simultanée. Pour ce faire, 200 μ L/lamelle (9 μ g/mL dans PBS, pH 7,4, 50% v/v glycérol) d'une solution de DNase I conjuguée au fluorochrome Alexa Fluor™ 488 (Invitrogen™, Cat# D12371, É. -U.), ainsi que 200 μ L/lamelle (0,165 μ M dans PBS, pH 7,4) d'une solution de Phalloidin-iFluor 405 (Abcam; Cat# ab176752, UK) ont été ajoutés sur les lamelles pendant 20 minutes, puis lavés trois fois au PBS (1x, pH 7,4). Les lamelles ont été séchées à température ambiante à l'obscurité et montées sur lame en utilisant du glycérol 90%.

Les images ont été acquises par microscopie confocale inversée (Nikon A1+) à l'aide d'un objectif Plan Apo λ 60x, en utilisant le logiciel NIS-Elements AR (version 4.00.12) pour l'acquisition. L'option d'empilement de plans Z (Stack 3D) a été utilisée. Pour ce faire, le panneau <ND acquisition> a été sélectionné, puis les plans supérieur et inférieur de la cellule ont été définis. Le logiciel a ensuite calculé le chevauchement des images ainsi que le nombre de captures nécessaires afin d'obtenir une reconstruction complète en 3D du champ d'observation. L'intensité des fluorochromes a été quantifiée en sommant l'ensemble des images en Z (Annexe A, Figure 8) à l'aide du logiciel ImageJ (version 1.54p).

2.5.2 Analyse de l'actine par cytofluorométrie en flux

Pour ces expériences, la lignée lymphocytaire T CD4 humaine Jurkat (ATCC TIB-152™) a été utilisée, à cause de son caractère en suspension. Les cellules ont été cultivées dans un milieu RPMI 1640 (Wisent inc, Cat# 350-000, CA), supplémenté avec 10% de FBS, du sodium pyruvate (1mM), de l'HEPES (10 mM) et 1% P/S.

Les cellules ont été récupérées, comptées et distribuées à 3×10^5 cellule par tubes facs. Elles ont ensuite été traitées avec soit de l'HE (23 μ M) ou de la Cytochalasine E (10 μ g/mL) pendant 1 heure. Des cellules sans traitement ont servi de témoin. Les cellules ont ensuite été centrifugées et lavées au PBS 1X tiède. Elles ont ensuite été fixées et perméabilisées avec le kit FIX & PERM cell perméabilisation (Thermofisher Cat# GAS003, É. -U.), suivant le protocole du détaillant. Les sites non spécifiques ont été bloqués avec une solution de blocage (PBS 1X, 1% BSA) pendant 30 minutes à température ambiante, à la suite desquelles les cellules ont été lavées 3 fois au PBS 1X. Elles ont ensuite été resuspendues dans une solution contenant la DNase I conjuguée au fluorochrome Alexa Fluor™ 488 (9 μ g/ml ; Invitrogen™, Cat# D12371), ainsi que la Phalloidin-iFluor 405 (0,165 μ M; Abcam; Cat# ab176752) et incubées à température ambiante pendant 30 minutes à l'obscurité. À la suite de deux autres lavages au PBS 1X, les cellules ont été resuspendues dans une solution de PBS 1x à une concentration de 1×10^6 cellules/mL. Enfin, les cellules ont été analysées sur le CytoFLEX (Beckman Coulter, Inc, CA) et analysées à l'aide du logiciel CytExpert Software v2.4.0.28 (Beckman Coulter, Inc, CA). Aucune compensation n'était nécessaire, étant donnée la division physique des lasers et filtres utilisés. La stratégie d'analyse est disponible dans l'annexe B (Figure 9).

2.6 Immunobuvardage

Les cellules MG63 préalablement conditionnées ont été lysées dans du tampon RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% désoxycholate de sodium, 0,1% SDS ; ThermoFisher™, Cat# 89900, É. -U.) complété avec 1% d'un mélange d'inhibiteurs de protéases (Sigma-Aldrich, Cat# P8340). Après une centrifugation à 10 000 RPM pendant 20 minutes à 4°C, les surnageants ont été transférés dans des nouveaux tubes. La quantification des protéines totales a été réalisée à l'aide du kit DC Protein Assay (Bio-Rad, Cat# 5000116, CA), selon les instructions du fabricant. Ensuite, 10 μ g de protéines totales ont été préparés dans du tampon Laemmli (32,9 mM Tris-HCl, 23,15% (p/v) glycérol, 0,05% SDS, 0,005% bleu de bromophénol, 2,5% β -mercaptoéthanol, pH 6,8), puis dénaturés à 95°C pendant 5 minutes. Les échantillons ont été séparés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide à 12% contenant du laurylsulfate de sodium (SDS-PAGE) supplémenté de 2,2,2-trichloroéthanol (TCE; 0,5% v/v ; Sigma-Aldrich, Cat# 8.08610, É. -U.), en utilisant un tampon de migration (192 mM glycine, 25 mM Tris et 0,1% SDS, pH

8,3) et une tension de 100 V. Une fois la migration terminée, le gel a été activé aux UV à l'aide du ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, CA) pour visualiser la qualité du gel et les protéines totales. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) à faible fluorescence (Millipore, Cat# IPFL00005, É. -U.), préalablement activée dans du méthanol à 70% puis équilibrée dans du tampon de transfert (192 mM glycine, 25 mM Tris, 10% (v/v) méthanol, pH 8,3). Le transfert a été effectué à ampérage constant (350 mA) pendant 90 minutes. Les membranes ont été bloquées dans une solution TBS-Tween 0,5% (TBS-T) contenant 3% de BSA pendant 2 heures à température ambiante. Après trois lavages au TBS-T, les membranes ont été incubées à 4°C pendant 16 heures avec les anticorps primaires suivants : anti-cofiline (1:1000 ; Cell Signaling (D3F9) XP® Rabbit mAb, Cat# 5175, É. -U.), anti-phospho-cofiline (Ser3) (1:1000 ; Cell Signaling Antibody, Cat# 3311, É. -U.) ou anti-HO-1 IgG1 monoclonal (1:1000 ; Invitrogen, Cat# NBP1-97507, É. -U.). Après trois lavages au TBS-T, les membranes ont été incubées pendant 1 heure à température ambiante avec les anticorps secondaires appropriés. Après trois autres lavages au TBS-T, les membranes ont été incubées pendant 5 minutes dans le révélateur Clarity Max Western ECL Substrate (Bio-Rad, Cat# 1705062, CA). La détection des bandes a été réalisée avec le ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, CA), et leur analyse a été effectuée à l'aide du logiciel Image Lab (Bio-Rad, CA). Les membranes ont ensuite été incubées dans une solution de stripping Restore™ (Thermo Scientific™ Cat# 21059, É. -U.) pendant 15 minutes à température ambiante, puis de nouveau bloquées et réincubées pendant 1 heure avec l'anticorps anti- β -actine. L'intensité des bandes a été normalisée en fonction de celle de la β -actine ou des protéines totales (Bettencourt *et al.*, 2020 ; Maloy *et al.*, 2022), selon le cas.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Inhibition de la migration cellulaire des cellules MG63 par l'HE

La motilité cellulaire joue un rôle clé dans le remodelage osseux étant entre autres impliquée dans la communication cellulaire, la fusion cellulaire et le dépôt d'ostéoïde par les OSBs (Kim *et al.*, 2020 ; Thiel *et al.*, 2018). Nos résultats précédents (non publiés par le laboratoire) suggèrent que des traitements à l'HE (15 et 23 μM) durant 12h causent une diminution de la vitesse de migration cellulaire chez des cellules ostéoblastiques MG63. Pour confirmer ces résultats, nous avons effectué un test de migration avec cette même lignée cellulaire. Nous voulions ainsi déterminer si l'inhibition était dose-dépendante, en évaluant des concentrations d'HE variant de 5 à 20 μM .

Les cellules MG63 ont été mises en culture jusqu'à atteindre 90% de confluence. Dans le milieu des puits, un espace sans cellules a été créé en effectuant une éraflure dans la monocouche cellulaire. La capacité des cellules à combler cette espace dans le temps a été comparée pendant 18h avec ou sans HE. Les images représentant le temps initial et la 18^e heure de traitement sont présentées dans la Figure 3-A. Deux tests quantitatifs ont été effectués pour déterminer l'effet du traitement de l'HE, soit le pourcentage de l'aire recouverte par les cellules et la vitesse de migration, respectivement représenté dans la Figure 3-B; C et D.

Nous avons constaté que seule la concentration de 20 μM d'HE (Figure 3-B, C; triangles) entraîne un effet inhibiteur significatif sur la migration des cellules MG63 ($p < 0,05$). Cet effet inhibiteur lors du traitement de 20 μM a été évident à partir de la 14^e heure du traitement, où l'on a observé un retard de 5% dans l'aire recouverte par les cellules, comparativement au témoin. Progressivement, ce retard a été amplifié, atteignant une diminution de 13% à la 18^e heure du traitement (Figure 3-C). Le délai de la migration a été quantifié en calculant la vitesse de migration moyenne à partir de la pente de l'équation d'une régression linéaire (Figure 3-D). La vitesse moyenne de 5 expériences indépendantes avec les cellules MG63 traitées à l'HE 20 μM ($4,2 \times 10^4 \pm 0,6 \times 10^4 \mu\text{m}^2/\text{h}$) était significativement diminuée ($p = 0,0066$), comparativement aux cellules non traitées ($6,0 \times 10^4 \pm 0,7 \times 10^4 \mu\text{m}^2/\text{h}$). Ensemble, nos résultats montrent que l'HE réduit de manière significative la migration des MG63 uniquement lorsque sa concentration atteint ou dépasse 20 μM , dans un environnement *in vitro* contenant 10 % de SVF.

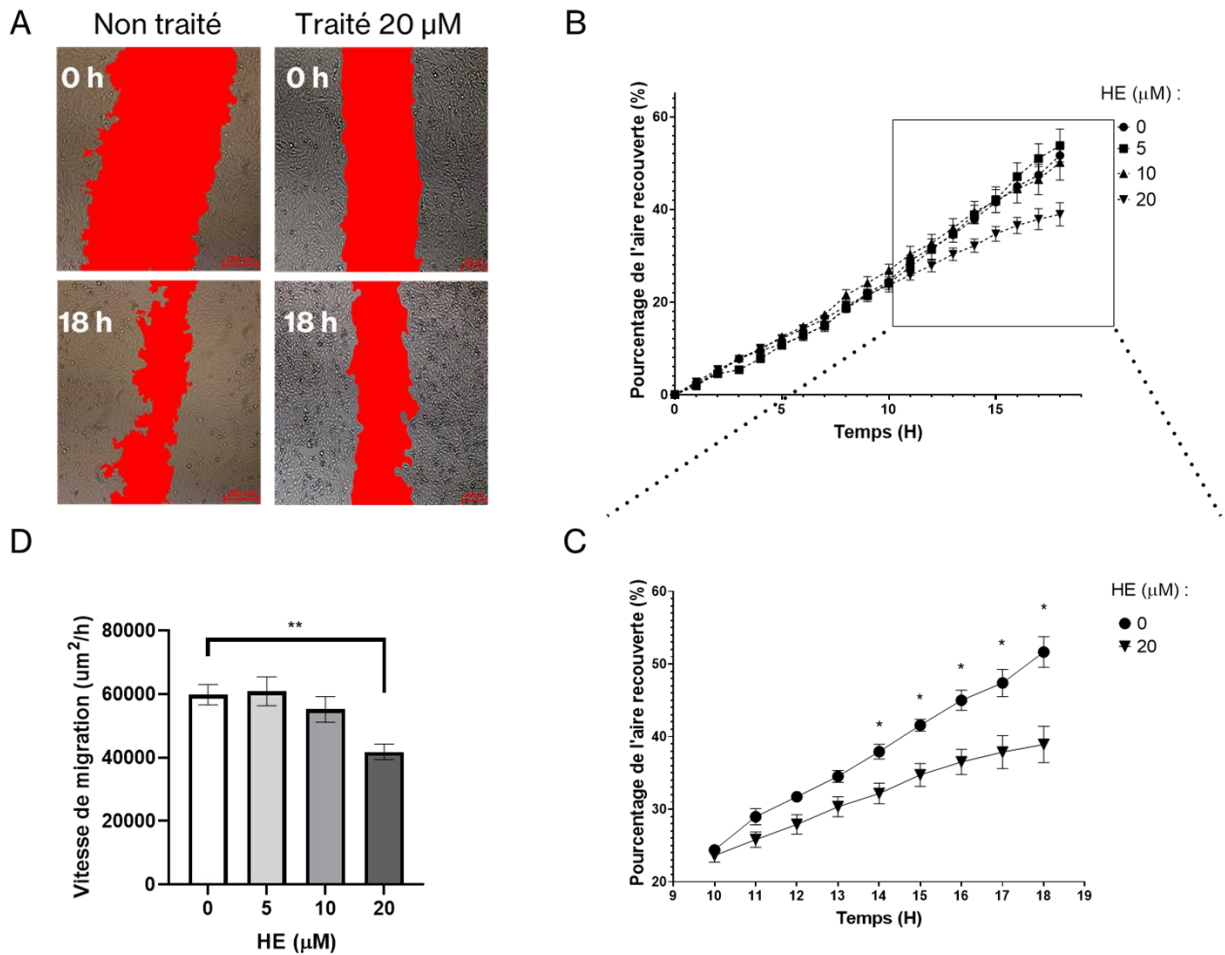


Figure 3 : Diminution de la vitesse de migration des cellules MG63 traitées avec l'HE

(A) Image obtenue de la migration à 0 heure et 18 heures par microscope confocale lors de photographies accélérées des MG63 témoin, ou conditionnées avec l'HE 20 μM . Les barres d'échelles : 250 μm . (B) Graphique représentant le pourcentage moyen ($\pm$ SEM) obtenu de l'aire recouverte par les cellules sous différents traitements d'HE (5, 10 et 20 μM). (C) Graphique montrant le pourcentage moyen ($\pm$ SEM) entre la 10^e et la 18^e heure pour les résultats de l'HE à 20 μM , ce qui correspond à la région encadrée noire du graphique précédent. Un test ANOVA à deux facteurs sur mesures répétées suivi d'un post-hoc de Dunnett's ont été effectués ($P < 0,05$ *). (D) Graphique à bande montrant la vitesse moyenne de cicatrisation de la plaie ($\mu\text{m}^2/\text{h} \pm$ SEM) pour les différentes concentrations d'HE utilisées (5, 10 et 20 μM). La vitesse moyenne a été calculée en utilisant la pente d'une régression linéaire. Les résultats représentent la moyenne de cinq mesures ($N = 5$). La valeur-P a été calculé en utilisant un test ANOVA à un facteur suivi d'un post-hoc de Dunnett's. Valeur-P $< 0,033$ *; $< 0,002$ **.

3.2 Effet transitoire de l'HE sur la fluidité de la membrane plasmique

En raison de sa nature hydrophobe, l'HE s'intercale dans les membranes cellulaires, entraînant la peroxydation des lipides (Giri *et al.*, 2018 ; Shaklai *et al.*, 1985). L'oxydation des lipides altère leur intégrité, augmente leur rigidité et réduit leur fluidité membranaire (Destro Bisol, 1999 ; Higdon *et al.*, 2012). Dans ce contexte, une diminution de la fluidité membranaire a été associée à une réduction de la motilité cellulaire (Gardeta *et al.*, 2022 ; Glatzel *et al.*, 2018 ; Gojova et Barakat, 2005). Avec ces évidences, nous avons émis l'hypothèse que la diminution de la migration cellulaire serait causée par l'insertion de l'HE dans la bicouche membranaire, la rendant moins fluide. Afin de vérifier une telle hypothèse, nous avons conditionné les cellules MG63 avec de l'HE à 20 μ M. Nous avons ensuite réalisé une analyse par FRAP à trois intervalles de temps distincts, soit à 1, 5 et 16 heures (Figure 4, A) pour vérifier si l'effet était transitoire ou persistant dans le temps.

Nos résultats révèlent que l'HE exerce un effet transitoire sur la fluidité membranaire, tel que mesuré par le temps de recouvrement de la fluorescence. En effet, lors du traitement de 1 heure à l'HE, une augmentation significative du temps moyen de recouvrement du signal a été mesurée, comparativement au témoin ($p < 0,0001$). Toutefois, à 5 heures post-traitement, le temps de recouvrement est revenu à des valeurs comparables au témoin. Ces résultats suggèrent que l'HE diminue rapidement, mais temporairement la fluidité membranaire.

Nous avons alors émis l'hypothèse que l'effet transitoire serait lié à la dégradation de l'hème, concurrente à une induction de l'enzyme HO-1, responsable du catabolisme de l'HE intracellulaire. Principalement localisée dans la membrane du réticulum endoplasmique lisse, la HO-1 catalyse la dégradation de l'HE en biliverdine, monoxyde de carbone ($\text{CO}^\cdot$) et ions ferreux (Fe^{2+}) (Funes *et al.*, 2020). En tant qu'enzyme limitante du processus, la HO-1 joue un rôle clé dans la régulation de la toxicité de l'HE (Duvigneau *et al.*, 2019). Afin de corrélérer l'induction de l'enzyme HO-1 avec l'effet transitoire de l'HE sur la fluidité membranaire, une analyse cinétique par immunobuvardage a été réalisée. Les cellules ont été traitées avec de l'HE à 20 μ M pendant des périodes de 1, 3 et 5 heures. Les intervalles de temps ont été sélectionnés en fonction de deux critères. D'une part, l'induction de l'HO-1 a été rapportée comme débutant après 1 heure de traitement à l'HE, avec un plateau atteint autour de 8 heures (Sacerdoti *et al.*, 2005 ; Wijayanti *et al.*, 2005). D'autre part, ces temps visaient aussi à comparer si cette induction se faisait de manière progressive avant 5 heures, et si l'induction coïncidait avec le retour à la normale de la fluidité membranaire qui avait été observé à 5 heures. Les résultats obtenus suggèrent une très faible induction

de la HO-1 après une heure de traitement, suivie d'une augmentation modérée à 3 heures, et d'une induction significativement élevée après 5 heures ($p = 0,0279$) (Figure 4, B). Ces données indiquent que l'induction de la HO-1 par l'HE se fait de manière progressive, et que son induction à 5 heures est en corrélation avec la restauration de la fluidité membranaire.

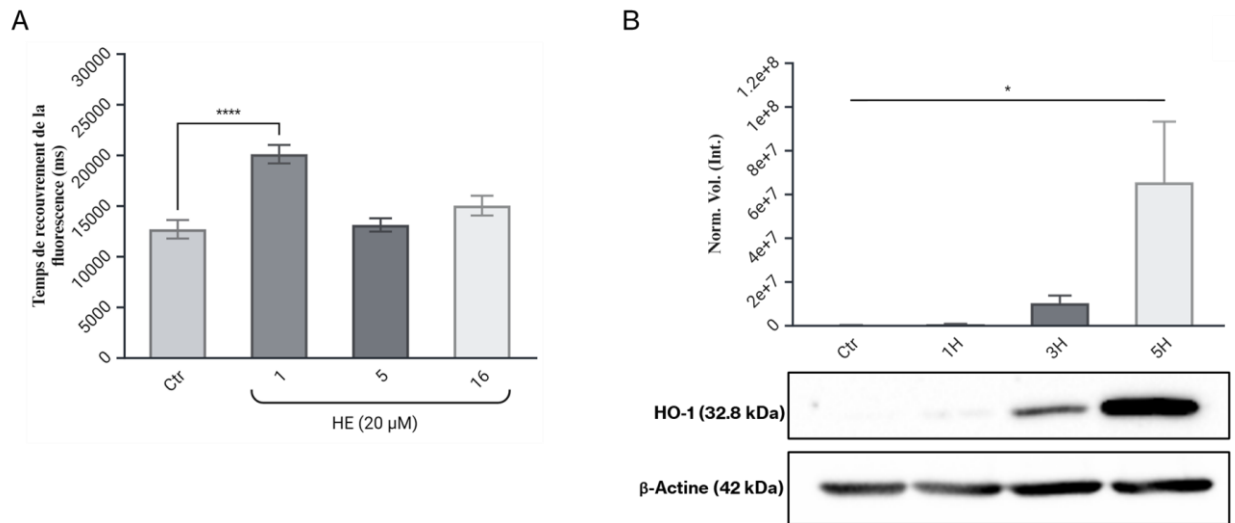


Figure 4 : Baisse de la fluidité membranaire induite par l'HE à 1 heure et rétablissement corrélé à l'induction de HO-1 à 5 heures

(A) Rétablissement de la fluorescence après photoblanchiment (FRAP) des cellules MG63 traitées à l'HE 20 μM durant 1, 5 et 16 heures. Le temps de demi-recouvrement moyen ($T_{1/2} \pm \text{SEM}$) a été calculé et représente entre 15 à 20 cellules par expérimentation ($N = 3$). (B) Suivi de l'induction de la HO-1 par immunobuvardage, avec les cellules MG63 traitées à l'HE 20 μM, selon différent temps soit à 1, 3 et 5 heures post-traitement. Les résultats représentent la moyenne de la mesure densitométrique ($\pm \text{SEM}$; $N = 3$). L'intensité des bandes a été normalisée avec celle de la β -actine. Des tests de Kruskal-Wallis et un Post-Hoc de Dunn's ont été effectués. Valeurs- $P < 0,05$ *; $< 0,0001$ ****

3.3 Impacte de l'hémine sur la dynamique de l'actine

Dans les sections précédentes, nous avons montré que l'HE réduit la motilité cellulaire après 14 heures de traitement et induit une perte transitoire de la fluidité membranaire, qui est complètement rétablie après 5 heures. Ce rétablissement coïncide chronologiquement avec l'induction de l'HO-1. La perte transitoire de la fluidité membranaire ne pourrait pas être la cause du ralentissement de la migration cellulaire, car cette dernière devient significative qu'à partir de 10 heures de conditionnement avec de l'HE. Mis en semble, ces éléments suggèrent que la diminution de la motilité, occasionnée par l'HE, pourrait impliquer des facteurs autres que la fluidité de la bicouche des phospholipides membranaires.

Nous avons alors orienté nos recherches sur la dynamique de l'actine, qui joue un rôle essentiel et central dans plusieurs processus biologiques, tels que la division et la fusion cellulaire, la signalisation intracellulaire et la migration (Dominguez et Holmes, 2011 ; Hall, 1998). Notre laboratoire, ainsi que d'autres équipes, ont montré qu'un traitement à l'HE inhibe significativement la fusion des précurseurs ostéoclastiques en cellules multinucléées (OSCs mature) (Das *et al.*, 2018 ; Liu *et al.*, 2016 ; Moreau *et al.*, 2012; données récentes non publiées). Ces processus cellulaires nécessitent, entre autres, une réorganisation adéquate du cytosquelette, et plus particulièrement de l'actine, pour en assurer un fonctionnement optimal (Faust *et al.*, 2019 ; S.R. Goodman, 2008). Dans cette perspective, Coló *et al.* (2023), ont démontré qu'un traitement de 80 μM d'HE pendant 24 heures chez la lignée LM3 murin, entraîne une diminution de l'expression de plusieurs catégories de protéines, notamment l'actine et ces protéines associées.

Dans ce contexte, nous avons étudié l'impact possible de l'HE sur la dynamique de l'actine par microscopie confocale, en utilisant une méthode d'acquisition par empilement de plans Z combiné à un double marquage. Cette approche fait appel à deux sondes, soit la DNase I, pour la détection des G-actine, et la phalloïdine, pour celle des F-actine, permettant ainsi de caractériser la structure et la localisation des G-actine et des F-actine dans les cellules MG63 traitées avec différentes concentrations d'HE (5 à 20 μM) pendant une heure (Figure 5).

Nous avons constaté qualitativement qu'un traitement de 20 μM d'HE entraîne une réorganisation de la distribution des F-actine dans les cellules (Figure 5, A). Plus précisément, les filaments cytoplasmiques, qui incluent les filaments ventraux en contact avec le substrat et les filaments dorsaux répartis dans le cytoplasme, diminuent visiblement. D'autre part, une augmentation de l'actine corticale a été observée,

suggérant un remodelage des F-actine vers la périphérie cellulaire, soit proche de la membrane. Les concentrations de 5 et 10 μM semblent aussi avoir ce type de réorganisation, mais plus faiblement.

Nous avons ensuite quantifié l'intensité totale de fluorescence émise par chaque cellule et selon chacun des fluorochromes. Cette quantification a été suivie d'une normalisation des intensités des différents traitements (5, 10 et 20 μM d'HE) par rapport à celles du témoin correspondant pour chaque fluorochrome (Figure 5-B), nous donnant la moyenne de l'intensité relative émise. L'intensité relative de la phalloïdine a diminué, suggérant une réduction dans l'abondance des F-actine. Cette réduction était significative pour les concentrations de 5 ($p = 0,03$) et 20 μM ($p = 0,003$). En ce qui concerne l'intensité de la DNase I, qui représente les G-actine, elle n'a montré aucun changement significatif peu importe la concentration d'HE. Par ailleurs, la même tendance a été constatée au niveau de l'intensité dans les protrusions cellulaires (Figure 5-C). En effet, le traitement à 20 μM d'HE a diminué significativement l'intensité relative de la phalloïdine dans les protrusions cellulaires ($p < 0,0001$). Ces résultats suggèrent que l'HE altère la stabilité des F-actine, sans changer de manière marquant la proportion de G-actine.

Dans le but de confirmer ces résultats, nous avons quantifié l'intensité de fluorescence des G-actine et F-actine dans une population de 10 000 cellules par cytofluorométrie, en utilisant le même double marquage que précédemment (Figure 6). Cependant, le fait qu'un traitement à la trypsine, qui est utilisée pour détacher les cellules adhérentes comme les MG63, affecte l'organisation de l'actine, nous a motivé à utiliser des cellules non adhérentes pour cette évaluation, soit la lignée lymphocytaire T CD4 humaine Jurkat. Afin de valider notre approche expérimentale, nous avons également utilisé la cytochalasine E (CytE) comme témoin positif : ce composé se lie à l'extrémité positive du F-actine, bloquant ainsi l'incorporation de nouveaux monomères, ce qui entraîne une diminution de la quantité de F-actine (Ikewaki *et al.*, 2003 ; Lambert *et al.*, 2023). De plus, la CytE peut aussi séquestrer les G-actine, diminuant davantage leur incorporation à la région positive du filament (Ruggiero et Lalli, 2021).

Comme anticipé, la quantité de G-actine ($p = 0,0417$) et de F-actine ($p = 0,0049$) a diminué significativement par le traitement à la CytE. Par ailleurs, de manière intéressante, les cellules Jurkat traitées à l'HE présentaient une augmentation significative de la quantité de G-actine, sans avoir d'effet apparent sur la quantité de F-actine. Ceci est contraire aux données obtenues dans la lignée ostéoblastique MG63, où une diminution des F-actine avait été observée, sans changement au niveau des G-actine.

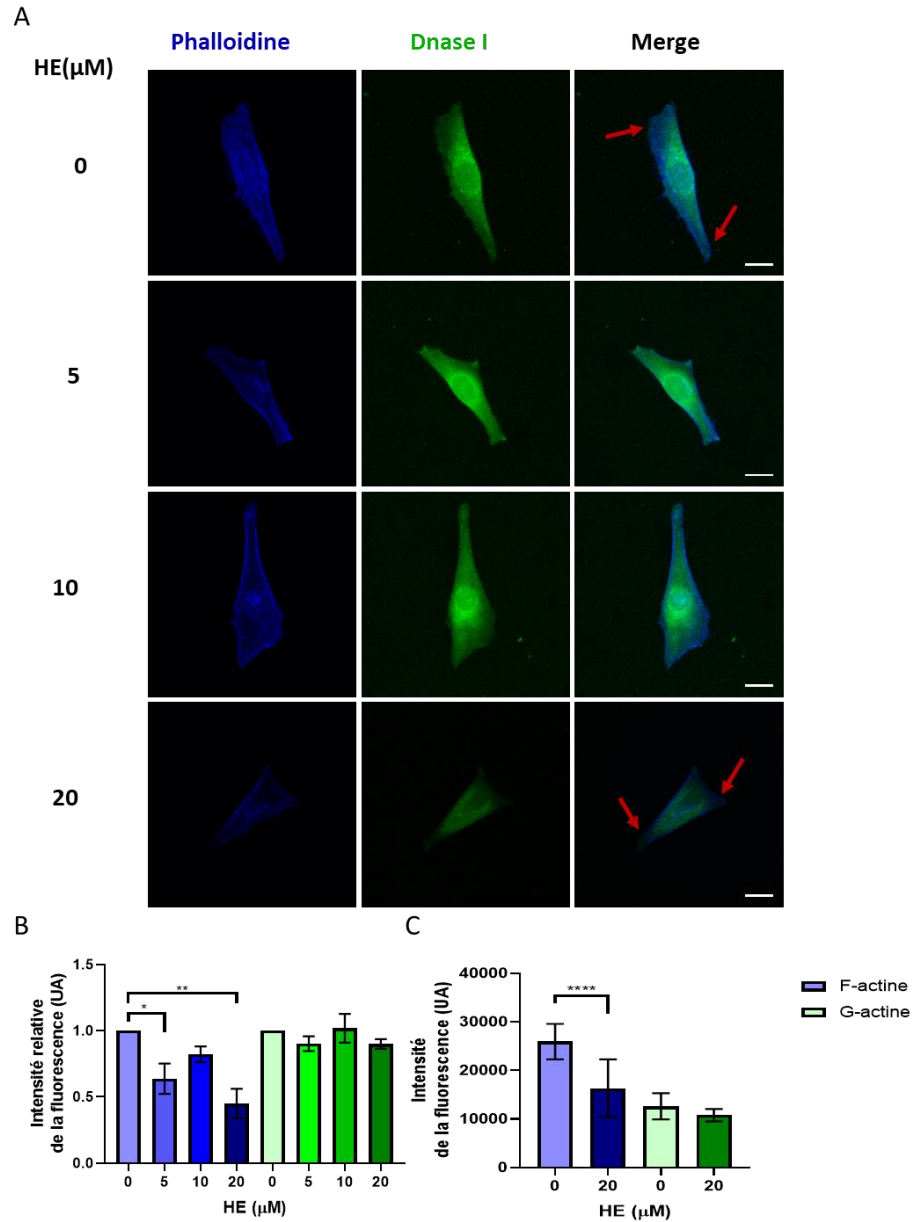


Figure 5 : Baisse de la F-actine, sans effet sur la G-actine, chez des cellules MG63 traitées avec de l'HE

Les cellules ont été ensemencées sur des lamelles de verre stérilisées sous UV, et ont ensuite été soumises à divers traitements d'HE (5, 10 et 20 μM) pour la durée d'une heure. Les cellules ont ensuite été simultanément colorées avec la DNase I conjuguée à l'Alexa Fluor™ 488 pour marquer la G-actine (vert), ainsi que la phalloïdine-iFluor 405 pour marquer la F-actine (bleu). A) Panneau montrant le marquage type d'une cellule par condition, incluant le marquage individuel de la G-actine, de la F-actine et la superposition des deux. B) Graphique à bande illustrant l'intensité relative ± SEM (UA) des marquages de la F-actine et de la G-actine de 20 cellules par conditions (n=3). C) Graphique à bande montrant la diminution de l'intensité de la phalloïdine dans les protrusions (flèches rouges, panneau A) lors du traitement à 20 μM d'HE. Les données représentent la moyenne de l'intensité de la fluorescence ± SEM. Les analyses subséquentes ont été effectuées à l'aide du logiciel ImageJ. Les barres d'échelles : 20 μm. Des tests de Kruskal-Wallis et un Post-Hoc de Dunn's ont été effectués. Valeur-P < 0,05 *; < 0,001 **; < 0,0001 ****

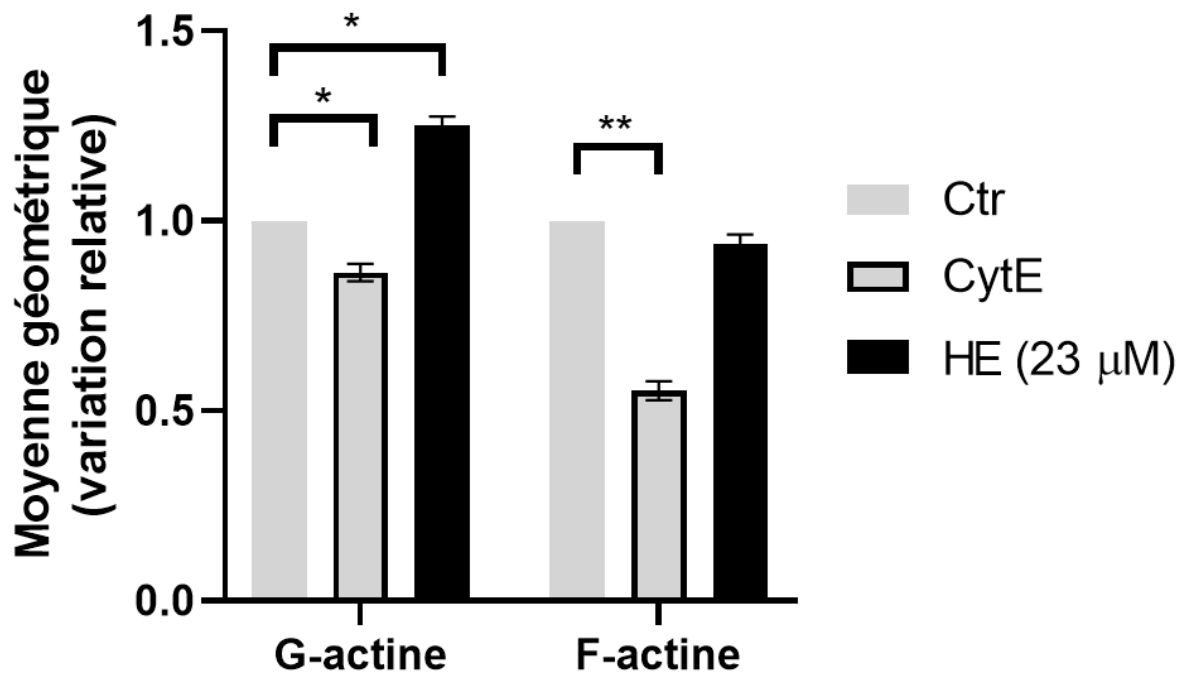


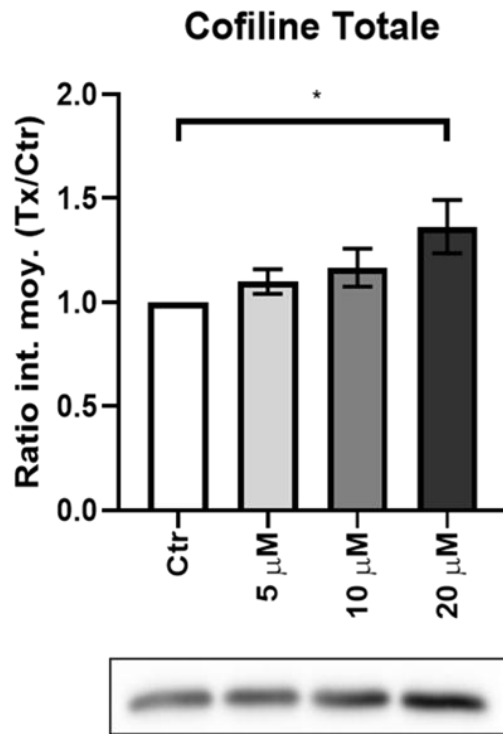
Figure 6 : Analyse de la dynamique de l'actine sous un traitement de Cytochalasine E et de l'HE chez les cellules Jurkat. Les lymphocytes T CD4 humains Jurkat ont été traités soit à la CytE, soit à l'HE (23 μM) pendant une heure ou sont restés sans traitement (Ctr). Les cellules ont été fixées et perméabilisées, puis traitées simultanément à la DNase I conjuguée au fluorochrome Alexa Fluor™ 488 et à la Phalloïdine IFluor 408. Les résultats représentent trois expériences indépendantes (N = 3). Un test ANOVA à deux facteurs suivis d'un post-hoc de Dunnett's a été effectué. $P < 0,05$ *; $< 0,002$).

3.4 Augmentation de l'expression de la cofiline

En raison des observations précédemment citées, nous avons émis l'hypothèse que l'HE pourrait affecter les protéines accessoires de l'actine, ce qui expliquerait la réorganisation et la perte de F-actine observées. La cofiline semblait une candidate particulièrement intéressante, car elle est une régulatrice clé de la dynamique de l'actine. En forme active, donc non phosphorylée, la cofiline se lie aux F-actine et facilite leur dépolymérisation, libérant des G-actine pour la formation de nouveaux filaments. Par ailleurs, sous sa forme inactive, soit phosphorylée, la cofiline perd son affinité pour l'actine, l'empêchant d'accomplir cette fonction (Wioland et al., 2017). De plus, Sayeed *et al.*, (2017) ont proposé qu'un conditionnement avec l'HE conduit à une augmentation de l'expression de la cofiline chez les cellules microgliales.

L'expression de la cofiline a été analysée par immunobuvardage afin d'évaluer l'impact de l'HE sur son expression totale et sur l'équilibre entre les formes active (non phosphorylée) et inactive (phosphorylée). Les cellules MG63 ont été traitées pendant 1 heure avec 20 μ M d'HE, puis lysées pour permettre l'analyse de l'expression de la cofiline (Figure 7). Nos résultats montrent une augmentation dose-dépendante de l'expression totale de la cofiline, avec un effet significatif à 20 μ M d'HE ($p = 0,0323$). Par ailleurs, le niveau de cofiline phosphorylée n'a pas été affecté par les traitements. Ces résultats semblent indiquer que l'HE stimule la hausse de l'expression totale de la cofiline dans les cellules MG63, tout en maintenant constante la proportion de sa forme phosphorylée (inactive).

A.



B.

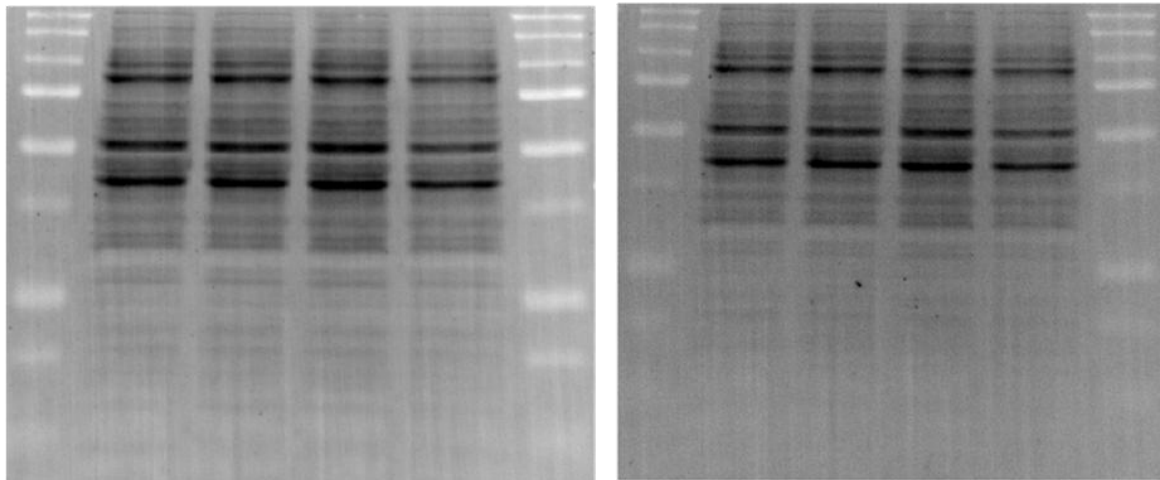
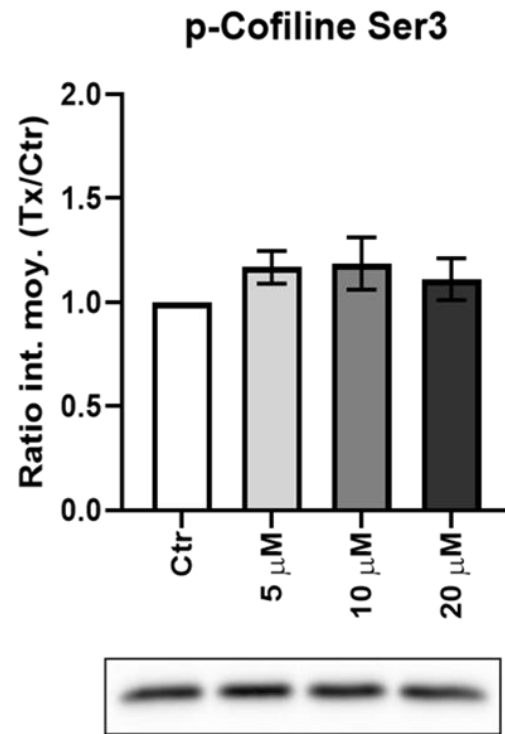


Figure 7 : Effet de l'HE sur l'expression de la forme active et inactive de la cofiline

Les cellules MG63 ont été traitées avec l'HE (5-20 μ M) durant 1 heure, puis lysées dans un tampon RIPA. Les protéines totales ont ensuite été séparées par SDS-PAGE, transférées sur une membrane de PVDF, qui a été ensuite bloquée au BSA 3% et traitée avec un anticorps spécifique monoclonal de la Cofiline totale (A). À la suite de la détection de la cofiline totale (18,5 kDa), la membrane a été incubée dans une solution de stripping Restore™, puis bloquée à nouveau et traitée avec l'anticorps monoclonal contre la phospho-Cofiline (p-Cofiline) Ser3 (B). L'intensité des bandes a été normalisée avec celle des protéines totales. Un test de Kruskal-Wallis et un Post-Hoc de Dunn's ont été effectués. Valeur-P < 0,05 *

CHAPITRE 4

DISCUSSION

L'hème (Protoporphyrine IX ferrique) libre dans le plasma est caractéristique des pathologies hémolytiques comme le paludisme, la thalassémie et la drépanocytose; ces conditions sont aussi caractérisées par une perte significative de la masse osseuse (Behzadifard *et al.*, 2024 ; Hernigou *et al.*, 2003 ; Moreau *et al.*, 2012). Des travaux antérieurs de notre laboratoire ont mis en évidence chez des souris BALB/c ayant subi l'hémolyse aiguë, qu'elle soit induite par une infection par *Plasmodium* ou par des agents hémolytiques, une réduction significative de la densité osseuse minéralisée, ainsi que les tissus osseux trabéculaires après une courte période de 10 - 12 jours (Moreau *et al.*, 2012). Ce constat est cohérent avec le rythme rapide de renouvellement osseux reporté chez la souris, dont le cycle de remodelage s'effectue en moyenne sur 14 jours (Jilka, 2013), rendant possible la constatation d'un déséquilibre osseux relativement en peu de temps. Dans le contexte de l'hémolyse intravasculaire, la destruction massive des érythrocytes entraîne une libération importante d'hémoglobine et de groupements prosthétiques d'hème (rapidement oxydé en HE), pouvant dépasser des concentrations de 20 μ M dans le plasma (Carrasco-Pozo *et al.*, 2020 ; Layer, 2020).

Des résultats non publiés de notre laboratoire ont reproduit cette perte rapide de masse osseuse chez des souris BALB/c soumises à des injections d'HE (10 mg/kg, par voie intrapéritonéale) pendant trois jours consécutifs, sur une période de deux semaines. À ces doses, l'hème/l'HE libre atteint des concentrations comparables à celles mesurées lors d'épisodes d'hémolyse aiguë, en tenant compte de la concentration injectée et du volume sanguin des souris utilisées. Dans nos modèles expérimentaux, la diminution des marqueurs sériques de l'OCN, du P1NP et du TRAP5b suggère respectivement une diminution dans la formation osseuse et une baisse du nombre d'OSCs. Néanmoins, le taux de résorption osseuse par les OSCs restait inchangé, tel qu'évalué par le marqueur sérique de résorption (CTX). Par ailleurs, d'autres données récentes de notre laboratoire indiquent une diminution marquée du nombre de progéniteurs ostéoclastiques et de leur capacité à fusionner en cellules multinucléées matures (Résultats non publiés).

D'autres résultats de notre laboratoire soulignent également l'effet négatif de l'HE sur la migration des cellules ostéoblastiques, la formation des OSCs et la fusion des macrophages *in vitro* (Article en préparation; Scorza T, *et al.*). Pris ensemble, ces résultats nous ont conduit à caractériser l'impact de l'HE

sur la fluidité membranaire, ainsi que sur la dynamique de l'actine et de certaines protéines associées, qui sont des éléments essentiels aux processus de migration, de fusion et d'adhésion cellulaire.

Nos résultats préliminaires (non publiés) suggèrent que des traitements à l'HE (15 et 23 μM) pendant 12 heures entraînent une diminution de la vitesse de migration des cellules ostéoblastiques MG63. Afin de confirmer cet effet et d'évaluer s'il dépendait de la dose, nous avons testé des concentrations d'HE comprises entre 5 et 20 μM lors d'un test de migration de 18 heures (Figure 3). Le test de migration utilisé dans notre étude repose sur un *scratch test*, un modèle de migration collective où les cellules migrent afin de combler un espace vide créé mécaniquement, plutôt que de répondre à un gradient chimiotactique. Ce type de migration cellulaire imite un processus de régénération tissulaire, soit des cellules qui se déplacent pour occuper toute la surface disponible, indépendante d'un signal spécifique (Grada *et al.*, 2017). Nos observations indiquent que 14 heures après le début de l'essai, l'HE inhibe significativement la migration des MG63 et uniquement à des concentrations proches ou supérieures à 20 μM , dans des conditions *in vitro* contenant 10% de SVF.

Un facteur essentiel à considérer dans nos conditions expérimentales *in vitro* est l'impact du SVF à 10% sur la biodisponibilité de l'HE extracellulaire. Le SVF contient plusieurs protéines, notamment l'albumine et l'hémopexine, qui possèdent une forte capacité de liaison à l'HE, influençant ainsi son interaction avec les cellules (Schaer *et al.*, 2013). L'hémopexine présente une affinité élevée pour l'HE ($K_d \approx 10^{-13}$ M), lui permettant de capturer efficacement l'HE libre dans un rapport stœchiométrique de 1:1 (Morgan *et al.*, 1976). En revanche, bien que l'albumine sérique puisse également se lier à l'HE, son affinité est considérablement plus faible ($K_d \approx 10^{-8}$ M) (Morgan *et al.*, 1976). Ces interactions pourraient expliquer la nécessité d'utiliser des concentrations relativement élevées d'HE (≥ 20 μM) afin d'observer un effet inhibiteur significatif sur la migration cellulaire des MG63, ainsi que le délai d'environ 14 heures avant l'apparition de cette inhibition.

Plusieurs études ont rapporté un impact négatif de l'HE sur la migration cellulaire, dans divers types cellulaires. Par exemple, l'HE perturbe la dynamique de l'actine et altère la migration des RAW264.7 par la suractivation de la Rho-GTase Cdc42 (Martins *et al.*, 2016). De plus, l'HE inhibe la migration des cellules microgliales de la lignée immortalisée SIM-A9 par l'induction de l'expression de la cofiline (Sayeed *et al.*, 2017). Une augmentation de la synthèse de l'HE a également été associée à une régulation négative de la migration des cellules cancéreuses de l'ovaire et du sein, via l'induction de la dégradation de Bach1 par

l'HE (Kaur *et al.*, 2021). Le rôle précis de Bach1 dans la migration demeure toutefois en cours d'investigation. Par ailleurs, Yesilkanal *et al.*, (2021) ont démontré que Bach1 augmente l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la mobilité cellulaire, notamment ROCK1, un élément clé de la voie Rho-GTPase Rho/ROCK, présenté à la Figure 2. Ces observations suggèrent que l'HE peut inhiber la migration cellulaire, en régulant les voies des Rho-GTPase, qui sont liées à la dynamique de l'actine et à l'activité des ABP, notamment la cofiline.

Paradoxalement, certaines études ont rapporté la stimulation de la migration par l'HE. Notamment, un traitement à l'HE a favorisé la migration des cellules musculaires lisses vasculaires A7r5 et des cellules épithéliales IEC. Le mécanisme proposé serait lié à l'activation du système NADPH oxydase par l'HE, entraînant une production accrue de ROS et l'activation de voies de signalisation sensibles au stress oxydatif, tel que ERK-2 et NF- κ B (Barcellos-de-Souza *et al.*, 2013 ; Moraes *et al.*, 2012). De plus, l'HE stimule la migration des progéniteurs endothéliaux en réponse au facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), via l'activation des voies AKT et ERK (Wang *et al.*, 2009). Ces observations suggèrent que l'HE peut favoriser la migration cellulaire dans certains contextes, en particulier dans les cas d'activation des voies ERK et AKT, qui sont bien établies comme promoteurs de la migration, de l'invasion et de la prolifération, notamment dans les cellules cancéreuses (Islam *et al.*, 2023 ; Tanimura et Takeda, 2017).

La migration des OSBs est un processus clé du remodelage osseux, étudié depuis des décennies (Jones et Boyde, 1977). Les effets de l'hème/HE libre sur cette fonction cellulaire demeurent largement inexplorés chez les OSBs. À la lumière des études précédemment citées, l'HE semble moduler la motilité cellulaire de manière variable selon le type cellulaire, certaines études rapportant un effet promoteur tandis que d'autres décrivent une inhibition de la migration. Nos résultats s'inscrivent dans cette tendance, révélant un effet inhibiteur, certes tardif, mais significatif de l'HE sur la migration cellulaire des OSBs.

Pour comprendre les mécanismes sous-jacents à cette inhibition, nous avons postulé qu'une diminution de la fluidité membranaire, induite par l'intercalation de l'HE dans les membranes cellulaires, pourrait limiter la migration des MG63. En effet, en raison de sa nature hydrophobe, l'HE possède la capacité de traverser la membrane plasmique et de s'insérer dans les bicouches de phospholipides, altérant ainsi l'intégrité et la fonctionnalité des membranes cellulaires (Shaklai *et al.*, 1985). L'HE ayant alors un accès à un grand réservoir de lipides provoque leur peroxydation nuisant d'autant plus à l'intégrité, la fluidité et

la perméabilité de la membrane (Higdon *et al.*, 2012). Dans ce contexte, notre laboratoire avait mis en évidence une diminution de la parasitémie de *P. c. adami* à la suite d'un prétraitement des érythrocytes avec de l'HE (Gaudreault *et al.*, 2015). Ces résultats corroboraient alors l'hypothèse retrouvée dans Destro Bisol (1999), selon laquelle l'HE augmenterait la rigidité des membranes cellulaires en induisant l'oxydation des phospholipides membranaires. Dans le cas des érythrocytes, cette fluidité permettrait, en théorie, l'invasion de la cellule par *Plasmodium*. Cette augmentation de la rigidité membranaire peut alors entraîner une diminution de la fluidité, laquelle a également été associée à une réduction de la migration cellulaire (Gardeta *et al.*, 2022 ; Glatzel *et al.*, 2018 ; Gojova et Barakat, 2005).

Nos observations par FRAP ont confirmé que l'HE réduit significativement la fluidité membranaire dans la première heure suivant son contact avec les cellules. Toutefois, cette réduction s'avère transitoire, avec un retour à des valeurs comparables à celle du témoin après 5 heures (Figure 4, A). Ces effets rapides sur la membrane cellulaire sont cohérents avec de nombreuses études portant sur l'HE et les membranes érythrocytaires, où il a été largement démontré que l'HE libre s'intercale rapidement dans la membrane des érythrocytes, entraînant leur déformation en quelques minutes (Chou et Fitch, 1981 ; Gaudreault *et al.*, 2015 ; Giri *et al.*, 2018 ; Kozlova *et al.*, 2014 ; Solar *et al.*, 1991). L'équipe de Kozlova *et al.* (2018) a ensuite associé ces effets à l'augmentation de la rigidité membranaire des érythrocytes. Enfin, l'équipe de Neftullaeva *et al.*, (2023) a démontré par microscopie à force atomique que l'HE augmente en moyenne la rigidité membranaire par un facteur de 2. Cette rigidité accrue, ainsi que la déformation de la membrane a été attribuée à l'interaction rapide entre l'HE et les protéines du cytosquelette membranaires, impliquant notamment un pontage de l'HE avec la spectrine et la protéine 4.1 (Liu *et al.*, 1985 ; Solar *et al.*, 1991).

D'une part, l'impact rapide de l'HE sur la fluidité membranaire n'est pas inattendu, puisqu'il s'inscrit dans un mécanisme bien documenté, bien que principalement étudié chez les érythrocytes. D'autre part, l'effet transitoire de cette modification, mise en évidence dans nos résultats, semble inédit et, à notre connaissance, n'a pas encore été documenté chez les OSBs. Ceci pourrait en partie être expliqué par l'action des protéines du sérum comme l'hémopexine et l'albumine, capables de dissocier les interactions de l'HE avec la spectrine et la protéine 4.1 (Solar *et al.*, 1991). Toutefois, cette capacité de dissociation du pontage diminue avec le temps d'incubation avec l'HE, ce qui à lui seul ne peut expliquer le retour de la fluidité après 16 h, puisque le pontage serait irréversible à ce temps (Figure 4, A; (Solar *et al.*, 1991)).

Nos résultats suggèrent que l'effet transitoire de l'HE sur la membrane pourrait être attribué à l'induction progressive de la HO-1, et à la dégradation concomitante de l'HE, comme l'a révélé notre analyse par immunobuvardage (Figure 4, B). Cette hypothèse est renforcée par les différences intrinsèques entre les érythrocytes et les OSBs. En effet, contrairement aux érythrocytes, qui sont dépourvus de noyau et présentent une expression minimale, voire inexistante, de l'HO-1 (Alves *et al.*, 2011), la lignée MG63 est capable d'induire l'expression de cette enzyme essentielle dans la dégradation de l'hème/HE. Ainsi, nous postulons que la rigidité membranaire, induite par l'intercalation de l'HE, serait plus persistante chez les érythrocytes, mais transitoire chez d'autres types cellulaires, comme les OSBs.

L'HO-1 est principalement localisée dans la membrane du réticulum endoplasmique lisse, où elle catalyse la dégradation de l'hème/l'HE en biliverdine, monoxyde de carbone ($\text{CO}^\cdot$) et ions ferreux (Fe^{2+}) (Funes *et al.*, 2020). De plus, cette protéine catalyse l'étape limitante de la dégradation de l'HE, ce qui en fait un élément crucial pour le contrôle de la toxicité de l'HE (Duvigneau *et al.*, 2019). Les produits de cette dégradation, notamment la biliverdine, la bilirubine et le $\text{CO}^\cdot$, sont bien connus pour leurs propriétés antioxydantes et leur rôle dans la régulation du stress oxydatif induit par l'HE (Wu *et al.*, 2019 ; Ziberna *et al.*, 2016). Par ailleurs, les ions Fe^{2+} libérés sont rapidement captés par la ferritine, limitant ainsi la peroxydation des lipides et prévenant l'entrée en ferroptose (Kumar et Bandyopadhyay, 2005). Cette induction progressive de l'HO-1 pourrait donc exercer des effets bénéfiques en réduisant la concentration d'HE et, par ses produits de dégradation, contrôler la balance des ROS, et restaurer la fluidité membranaire. Afin de confirmer l'importance de cette corrélation, il serait opportun de déterminer si ce retour à la normale est partiel ou total en présence d'inhibiteurs de l'HO-1. Enfin, il semble peu probable qu'une perte transitoire de la fluidité membranaire, réversible après 5 heures et corrélée à l'induction de l'HO-1, soit la seule responsable du ralentissement de la migration cellulaire des MG63 observé après 14 heures.

Un scénario à ne pas ignorer est celui d'une activité soutenue de la HO-1, qui pourrait avoir des effets négatifs sur les OSBs. En effet, Lin *et al.*, (2010) ont montré qu'une activité soutenue de la HO-1 induite par certains agents, tels que l'HE (20 μM), entraînait une diminution de la maturation et de la différenciation des OSBs. Plus précisément, ils ont observé que l'HE (20 μM) et l'un de ses produits de dégradation par l'HO-1, la bilirubine, réduisaient significativement l'expression des ARNm de l'OCN et du facteur de transcription *runt-related 2* (RUNX2), ainsi que la concentration en calcium des nodules minéralisés. Bien que la concentration de 20 μM d'HE n'ait pas eu d'effet significatif sur l'activité de l'alcaline phosphatase (ALP), des concentrations de 3 et 30 μM de bilirubine ont montré un effet inhibiteur

dose-dépendant sur cette enzyme (Lin *et al.*, 2010). De plus, Lin *et al.* (2010) ont mis en évidence que les ions ferreux (Fe^{2+}), également générés par la dégradation de l'HE par l'HO-1, réduisent l'expression des ARNm de l'ALP et de RUNX2, un phénomène corroboré par plusieurs études (Edwards *et al.*, 2021 ; Jiang *et al.*, 2022 ; Messer *et al.*, 2009 ; Zarjou *et al.*, 2010). Par ailleurs, l'inhibition de l'activité ostéoblastique lors de l'accumulation du fer a été associée à une induction soutenue de la ferritine (Balogh *et al.*, 2016).

En considérant ces facteurs, il serait pertinent de confirmer que le traitement par 20 μM d'HE induit une augmentation de la concentration intracellulaire en fer et en ferritine, et si cette accumulation diminue la capacité migratoire des cellules MG63. Par ailleurs, RUNX2, dont l'expression est réduite par l'HE et la bilirubine (Lin *et al.*, 2010), permet la migration des OSBs par la voie PI3K-Akt (Fujita *et al.*, 2004), une voie directement impliquée dans l'activation des Rho-GTPase (Rho, Rac, Cdc42) (Beier et Loeser, 2010), qui sont liées à la migration cellulaire, la réorganisation de l'actine et l'activité des ABPs (Hanna et El-Sibai, 2013).

La dynamique de l'actine joue un rôle essentiel dans les nombreux processus cellulaires, notamment la division cellulaire, la signalisation intracellulaire et la migration (Dominguez et Holmes, 2011 ; Hall, 1998). Étant donné l'importance de ces processus cellulaires chez les OSBs et les OSCs, il était pertinent de s'interroger sur l'impact de l'HE sur la dynamique de l'actine. En effet, plusieurs études, y compris celles menées par notre laboratoire, ont démontré qu'un traitement à l'HE inhibe significativement la fusion des précurseurs ostéoclastiques en OSCs matures (Das *et al.*, 2018 ; Liu *et al.*, 2016 ; Moreau *et al.*, 2012). Or, le bon fonctionnement de la fusion et de la migration cellulaire reposent sur une réorganisation fine et appropriée des F-actine (Faust *et al.*, 2019 ; S.R. Goodman, 2008). Sous cet angle, nous avons évalué l'impact d'un traitement d'une heure de durée, avec une concentration variante entre 5 et 20 μM d'HE sur l'intégrité, la localisation et la polymérisation de l'actine chez la lignée ostéoblastique MG63, en combinant une acquisition par microscopie confocale en empilement de plans Z avec un double marquage à la DNase I et à la phalloïdine, permettant respectivement la détection de la G-actine et du F-actine.

Nos observations suggèrent que l'HE altère la stabilité des F-actine, sans changer de manière marquant la proportion de G-actine de la lignée MG63 (Figure 5). Plusieurs études ont montré que l'HE pouvait perturber la dynamique de l'actine non seulement en induisant une réorganisation structurelle, mais aussi en modifiant directement son expression, ou celle de ces ABP (Coló *et al.*, 2023 ; Martins *et al.*, 2016 ; Sayeed *et al.*, 2017 ; Shaklai *et al.*, 1986). Par exemple, une analyse protéomique réalisée sur la lignée cellulaire LM3 (adénocarcinome mammaire murin) a révélé qu'un traitement prolongé à l'HE (80 μM , 24

h) affecte l'expression de plusieurs protéines, dont une diminution significative de l'actine (Coló *et al.*, 2023). Dans cette même étude, les auteurs ont également observé une réduction significative des fibres de stress dorsales et ventrales (Coló *et al.*, 2023). Nos résultats corroborent ces observations, montrant que l'HE altère la distribution du F-actine dans les cellules MG63 (Figure 5, A). Plus précisément, les filaments ventraux, qui sont perpendiculaires au substrat et ancrés aux adhésions focales (Maninova *et al.*, 2017), ainsi que les filaments dorsaux, répartis dans le cytoplasme, semblent visiblement diminués, tandis que ceux du cortex semblent moins affectés. Par ailleurs, Coló *et al.* (2023) ont également mis en évidence une réduction de l'expression de la taline et des intégrines, deux protéines essentielles au couplage entre les adhésions focales et la formation de fibres de stress (Calderwood et Ginsberg, 2003).

Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que la diminution de l'abondance du F-actine constatée dans les cellules MG63 traitées à l'HE pourrait être attribuable à une réduction des fibres de stress, structures étant constituées de faisceaux de F-actine interconnectés (Cramer *et al.*, 1997). Cette hypothèse est renforcée par l'analyse de la lignée lymphocytaire T CD4 humaine Jurkat, où aucun effet significatif sur la quantité de F-actine n'a été observé (Figure 6). Cette différence pourrait s'expliquer par l'absence de fibres de stress dans les lymphocytes, ces derniers ne formant pas ces structures même lorsqu'ils sont cultivés sur un substrat (Yeung *et al.*, 2005). Cette perte de fibre de stress, ainsi que la diminution de la connexion aux adhésions focales pourrait en partie expliquer la diminution de la migration cellulaire, puisque l'ancrage des fibres de stress aux adhésions focales est indispensable pour déclencher l'avancée de la cellule lors d'une migration directionnelle (Seetharaman et Etienne-Manneville, 2020).

Étant donné l'impact de l'HE sur l'organisation de l'actine et la diminution des F-actine, il était essentiel d'explorer si l'HE pouvait aussi affecter les protéines régulatrices qui orchestrent cette dynamique. Parmi elles, la cofiline se distinguait comme une candidate clé, en raison de son rôle dans la dépolymérisation des F-actine (Yeoh *et al.*, 2002). Nos résultats montrent une augmentation dose-dépendante de l'expression totale de la cofiline, sans une hausse significative de sa forme phosphorylée en Ser3 (Figure 7). Cela suggère que l'augmentation globale de la cofiline se traduit principalement par une hausse de sa forme active (non phosphorylée), ce qui peut favoriser ainsi la dépolymérisation des F-actine et contribuer à la réorganisation du cytosquelette. Ceci corrobore alors les résultats de Sayeed *et al.* 2017, où un traitement d'HE stimulait l'expression de la cofiline dans les cellules microgliales, ce qui a pour effet d'inhiber leur migration (Sayeed *et al.*, 2017).

La phosphorylation de la cofiline en Ser3, qui régule son inactivation, est principalement catalysée par LIMK, une kinase activée par les voies RhoA-GTPases/ROCK et Cdc42, qui ont été présentées dans la Figure 2 de l'état des connaissances (Bamburg *et al.*, 2021 ; Hanna et El-Sibai, 2013). Or, il a été démontré que l'HE inhibe l'activité des Rho-GTPases, bien que ses effets varient selon le type cellulaire. L'équipe de Shenoy *et al.* (2023) ont rapporté que l'HE réduisait l'expression de Cdc42 dans des cellules de glioblastome, entraînant une diminution de la migration cellulaire. De plus, Coló *et al.*, (2023) ont montré que l'HE pouvait agir en amont des GTPases en diminuant l'expression de GEF Arhgef2, suggérant ainsi une inhibition de l'activité de la RhoA-GTPase. Pris ensemble, ces résultats suggèrent que l'HE pourrait réduire l'activité de LIMK en inhibant sa phosphorylation par les GTPases RhoA et Cdc42, maintenant ainsi la cofiline dans un état actif (non phosphorylé) et conséquemment perturbant la dynamique de l'actine.

De leur côté, Martins et al. (2016) ont observé que l'HE induit une suractivation de Cdc42 via le GEF DOCK8, entraînant une inhibition de la phagocytose et de la migration des macrophages RAW264.7. Ces résultats, bien que contrastés avec ceux de Coló *et al.*, (2023) et Shenoy *et al.* (2023), indiquent que l'HE pourrait influencer différemment la dynamique de l'actine en fonction du type cellulaire, possiblement par des mécanismes distincts d'activation ou d'inhibition des GTPases. Par ailleurs, la majorité des études disponibles dans la littérature ont été réalisées sur des lignées cancéreuses ou immortalisées, soulignant donc la nécessité de valider nos observations dans des lignées ostéoblastiques primaires.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans cette étude, nous avons évalué l'impact potentiel de l'HE sur la fluidité membranaire et la dynamique de l'actine chez les OSBs, deux processus clés pour la migration et pour le remodelage osseux. Nos résultats montrent que l'HE inhibe significativement la migration des cellules MG63 un effet observé après 14h d'incubation et principalement à des concentrations égales ou supérieures à 20 μ M dans des conditions de culture contenant 10 % SVF. Or, nous avons constaté une baisse de la fluidité membranaire dès 1 heure de traitement à cette concentration d'HE. Toutefois, l'effet sur la fluidité membranaire était temporaire, se rétablissant après 5 heures et coïncidant avec l'induction de l'HO-1. En effet, l'induction progressive de l'HO-1 pourrait jouer un rôle protecteur, en réduisant la concentration intracellulaire d'HE et en contrôlant l'équilibre redox par la production de ses métabolites (Schaer *et al.*, 2013). Néanmoins, le mécanisme par lequel l'HO-1 contribue au rétablissement de la fluidité membranaire demeure à élucider.

Un autre élément à considérer est le rôle du cycle de renouvellement membranaire, un processus essentiel non seulement au maintien de la fluidité membranaire, mais également à la migration cellulaire (Tanaka *et al.*, 2017). Ce renouvellement repose notamment sur la fusion de vésicules contenant des lipides et des protéines adressées à la membrane plasmique, ainsi que sur l'endocytose de portions de membrane déjà en place (Tanaka *et al.*, 2017). Dans un contexte de stress oxydatif, comme celui induit par l'HE, les lipides membranaires peuvent être altérés, entraînant une rigidification de la membrane (Higdon *et al.*, 2012). Ce stress pourrait également retarder ou perturber le mécanisme de fusion vésiculaire, compromettant ainsi l'efficacité du renouvellement (Das *et al.*, 2018). Or, ce même processus de renouvellement membranaire pourrait agir comme un mécanisme réparateur. Il pourrait remplacer progressivement les lipides oxydés par des lipides intacts, ou encore modifier la composition lipidique de la membrane, par exemple en augmentant localement la concentration en cholestérol, ce qui pourrait contribuer au rétablissement temporaire de la fluidité membranaire (Das *et al.*, 2018). De plus, la présence de protéines sériques comme l'hémopexine et l'albumine, qui agissent comme des transporteurs/extracteurs de l'HE libre dans le SVF, pourrait limiter la biodisponibilité de l'HE et son interaction avec la membrane (Morgan *et al.*, 1976). Ceci pourrait alors retarder l'inhibition de la migration cellulaire. Ainsi, cette rigidification temporaire (rigide à 1 heure) ne semble donc pas être l'un des facteurs expliquant le ralentissement de la migration des cellules MG63, qui était plutôt observé après 14 heures.

D'un autre côté, une activité prolongée et soutenue de la HO-1 pourrait inhiber la migration et la différenciation des OSBs, possiblement en raison de l'accumulation de ses produits de dégradation persistants (Lin *et al.*, 2010). Tel qu'une concentration soutenue de la ferritine par le fer (Balogh *et al.*, 2016), et par l'augmentation de la concentration en bilirubine (Lin *et al.*, 2010). Ces protéines sont connues pour inhiber l'expression de Runx2 (Balogh *et al.*, 2016 ; Lin *et al.*, 2010), et diminuer la migration et la différenciation des OSBs par la voie PI3K-Akt (Fujita *et al.*, 2004). Or, cette voie joue également un rôle important dans l'activation des Rho-GTPase (Beier et Loeser, 2010), qui est liée à la migration cellulaire, la réorganisation de l'actine et l'activité des ABPs (Hanna et El-Sibai, 2013). En ce qui concerne la dynamique de l'actine, nos résultats suggèrent que l'HE diminue l'abondance des F-actine ventraux, ce qui pourrait être attribué à une réduction des fibres de stress, étant composées de faisceaux interconnectés de F-actine (Cramer *et al.*, 1997). Nous avons aussi constaté une augmentation dose-dépendante de l'expression totale de la cofiline, sans modification de sa phosphorylation en Ser3. Cette hausse de la cofiline sous sa forme active (non phosphorylé), pourrait causer une dépolymérisation précoce des filaments, entraînant une réorganisation du cytosquelette et une diminution sur le long terme de la migration.

Mis en semble, ces résultats suggèrent que l'HE peut affecter la migration ostéoblastique, en modulant la réorganisation des F-actine, par ce qui nous semble une augmentation de la forme active de la cofiline. Ceci pourrait potentiellement être expliqué par l'inhibition des Rho-GTPases (RhoA et Cdc42) par l'HE, diminuant la phosphorylation de LIMK, maintenant ainsi la cofiline dans un état actif, ce qui déstabiliserait la dynamique de l'actine (Bamburg *et al.*, 2021 ; Hanna et El-Sibai, 2013).

Étant donné le caractère exploratoire de cette étude, le modèle proposé exige des recherches futures, et plusieurs corrélations doivent être testées afin d'établir un lien de causalité. Notamment, il serait essentiel de déterminer si l'induction de l'HO-1 est directement responsable du retour à la normale de la fluidité membranaire. Pour cela, deux approches complémentaires pourraient être envisagées : d'une part, en pré-incubant les cellules MG63 avec un inducteur de l'HO-1, puis en évaluant par FRAP si l'HE induit toujours une rigidification membranaire. D'autre part, en utilisant un inhibiteur sélectif de l'HO-1 afin de déterminer si le retour à la normale de la fluidité membranaire est partiellement ou totalement aboli après 5 heures de traitement à l'HE. Par ailleurs, il serait aussi pertinent d'évaluer si un traitement de 20 μ M d'HE entraîne une accumulation intracellulaire en fer et en ferritine, et si cette accumulation prolongée pourrait contribuer à la diminution de la capacité migratoire des cellules MG63.

L'impact de l'HE sur d'autres voies de signalisation impliquées dans la migration et la différenciation ostéoblastique, telles que la voie PI3K-Akt et l'activité des Rho-GTPases, mérite également d'être exploré. Plus précisément, il serait intéressant de vérifier, par immunobuvardage, si l'HE induit une modulation de l'expression et/ou de l'activité des Rho-GTPases (RhoA et Cdc42), ce qui pourrait expliquer la diminution de l'abondance des F-actine observée dans nos expériences. La diminution des F-actine après traitement à l'HE pourrait aussi être validée par immunobuvardage. Il serait aussi pertinent de vérifier si cette diminution des F-actine est durable dans le temps, ou si comme l'augmentation de la rigidité membranaire elle est plutôt temporaire. Enfin, étant donné que l'expression de la cofiline totale a augmenté de manière dépendante de la dose, sans modification significative de sa phosphorylation en Ser3, il serait pertinent de confirmer cette augmentation par une méthode de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) quantitative en temps réel après transcription inverse (RT-qPCR). Une approche additionnelle, telle que la co-immunoprécipitation, pourrait être envisagée afin d'étudier si l'HE modifie spécifiquement les interactions fonctionnelles entre la cofiline, l'actine et les Rho-GTPases.

ANNEXE A

Images représentant un Z-stack au confocal

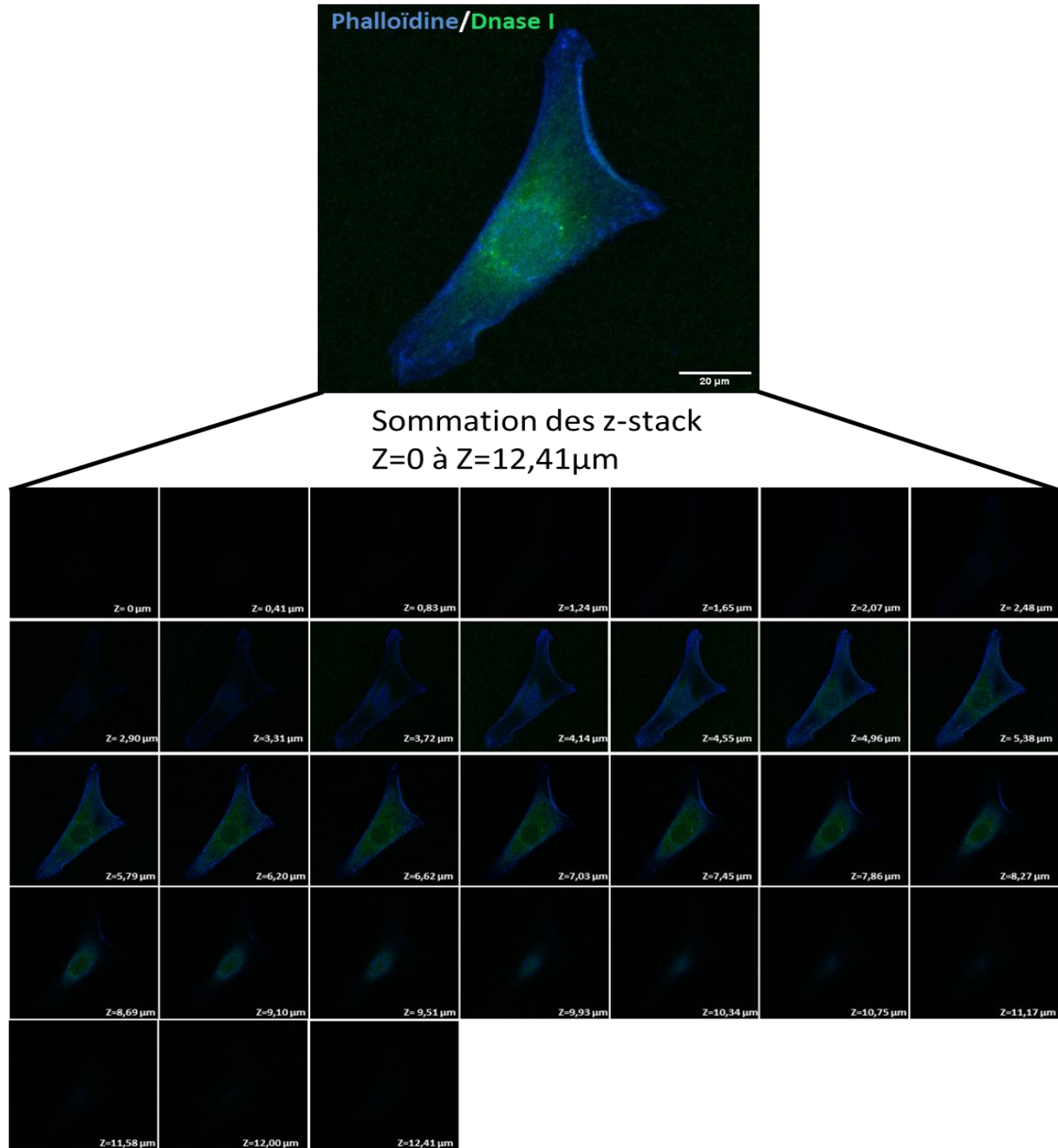


Figure 8 : Exemple d'empilement de plans Z (Stack 3D) par confocale des MG63 témoin.

À la suite des colorations par les sondes (phalloïdine (bleu) et la G-actine (vert)), les cellules ont été montées sur lamelle. L'empilement a été fait par ImageJ en utilisant l'option <z-project> suivi de la sommation de toutes les images. Enfin, la fluorescence totale de chacune des cellules a été calculée en la délimitant par un ROI.

ANNEXE B

Stratégie d'analyse de la Cytofluorométrie

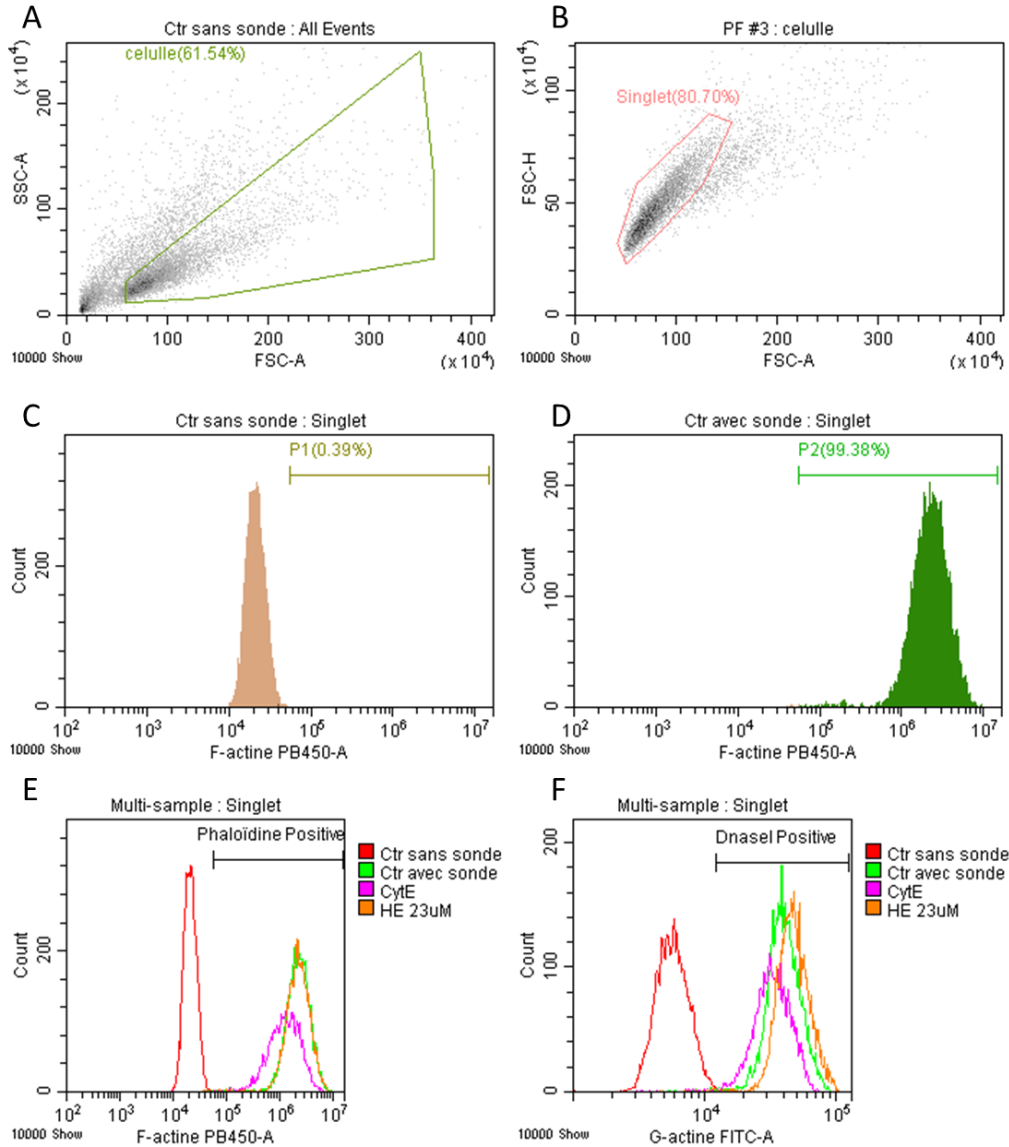


Figure 9 : Stratégie d'analyse de la dynamique de l'actine par cytofluorométrie en flux.

Les lymphocytes T CD4 Jurkat ont été traités avec ou sans CytE/HE, fixés et perméabilisés, puis marqués simultanément avec deux sondes : la DNase I et la phalloïdine. L'analyse a été réalisée en plusieurs étapes : exclusion des débris (A) et des doublets (B), puis définition des populations positives en utilisant le contrôle sans sonde comme référence pour établir les seuils de l'auto-fluorescence (C-D). Enfin, les intensités moyennes géométriques de la fluorescence ont été calculées (E-F) et sont présentées à la Figure 6.

BIBLIOGRAPHIE

- Abe, H., Nagaoka, R. et Obinata, T. (1993). Cytoplasmic Localization and Nuclear Transport of Cofilin in Cultured Myotubes. *Experimental Cell Research*, 206(1), 1-10.
<https://doi.org/10.1006/excr.1993.1113>
- Allen, M. R. et Burr, D. B. (2019). Bone Growth, Modeling, and Remodeling. Dans *Basic and Applied Bone Biology* (p. 85-100). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813259-3.00005-1>
- Alves, L. R., Costa, E. S., Sorgine, M. H. F., Nascimento-Silva, M. C. L., Teodosio, C., Bárcena, P., Castro-Faria-Neto, H. C., Bozza, P. T., Orfao, A., Oliveira, P. L. et Maya-Monteiro, C. M. (2011). Heme-Oxygenases during Erythropoiesis in K562 and Human Bone Marrow Cells. *PLoS ONE*, 6(7), e21358. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021358>
- Arias, C. F., Herrero, M. A., Echeverri, L. F., Oleaga, G. E. et López, J. M. (2018). Bone remodeling: A tissue-level process emerging from cell-level molecular algorithms. *PLOS ONE*, 13(9), e0204171. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204171>
- Arruda, M. A., Rossi, A. G., de Freitas, M. S., Barja-Fidalgo, C. et Graça-Souza, A. V. (2004). Heme Inhibits Human Neutrophil Apoptosis: Involvement of Phosphoinositide 3-Kinase, MAPK, and NF- κ B. *The Journal of Immunology*, 173(3), 2023-2030. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.3.2023>
- Avissar, N., Shaklai, M. et Shaklai, N. (1984). The interaction of hemin with skeletal muscle actin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 786(3), 179-187. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(84\)90087-6](https://doi.org/10.1016/0167-4838(84)90087-6)
- Baba, S. P. et Bhatnagar, A. (2018). Role of thiols in oxidative stress. *Current Opinion in Toxicology*, 7, 133-139. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.03.005>
- Baldwin, C., Pandey, J. et Olarewaju, O. (2022). Hemolytic Anemia. Dans *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558904/>
- Ballas, S. K. (1990). The Pathophysiology of Hemolytic Anemias. *Transfusion Medicine Reviews*, 4(3), 236-256. [https://doi.org/10.1016/S0887-7963\(90\)70267-2](https://doi.org/10.1016/S0887-7963(90)70267-2)
- Balogh, E., Tolnai, E., Nagy, B., Nagy, B., Balla, G., Balla, J. et Jeney, V. (2016). Iron overload inhibits osteogenic commitment and differentiation of mesenchymal stem cells via the induction of ferritin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1862(9), 1640-1649. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.06.003>
- Bamburg, J. R. (1999). Proteins of the ADF/Cofilin Family: Essential Regulators of Actin Dynamics. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 15(1), 185-230. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.15.1.185>
- Bamburg, J. R., Minamide, L. S., Wiggan, O., Tahtamouni, L. H. et Kuhn, T. B. (2021). Cofilin and Actin Dynamics: Multiple Modes of Regulation and Their Impacts in Neuronal Development and Degeneration. *Cells*, 10(10), 2726. <https://doi.org/10.3390/cells10102726>

- Barcellos-de-Souza, P., Moraes, J. A., de-Freitas-Junior, J. C. M., Morgado-Díaz, J. A., Barja-Fidalgo, C. et Arruda, M. A. (2013). Heme modulates intestinal epithelial cell activation: involvement of NADPHox-derived ROS signaling. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 304(2), C170-C179. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00078.2012>
- Batchelor, E. K., Kapitsinou, P., Pergola, P. E., Kovesdy, C. P. et Jalal, D. I. (2020). Iron Deficiency in Chronic Kidney Disease: Updates on Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *Journal of the American Society of Nephrology*, 31(3), 456-468. <https://doi.org/10.1681/ASN.2019020213>
- Behzadifard, S., Arianezhad, A., Nazarinia, D., Behmanesh, R., Sinaei, H., Dezfuli, D. A. et Behzadifard, M. (2024). Bone Mineral Density, Osteoporosis Prevalence and Influential Factors in Osteogenesis in Patients with Beta Thalassemia Major: A Cross-Sectional Study. *Iranian Journal of Public Health*. <https://doi.org/10.18502/ijph.v53i8.16294>
- Beier, F. et Loeser, R. F. (2010). Biology and pathology of Rho GTPase, PI-3 kinase-Akt, and MAP kinase signaling pathways in chondrocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 110(3), 573-580. <https://doi.org/10.1002/jcb.22604>
- Belcher, J. D., Beckman, J. D., Balla, G., Balla, J. et Vercellotti, G. (2010). Heme Degradation and Vascular Injury. *Antioxidants & Redox Signaling*, 12(2), 233-248. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2822>
- Bennett, L. F., Liao, C. et Paulson, R. F. (2018). Stress Erythropoiesis Model Systems. Dans J. A. Lloyd (dir.), *Erythropoiesis* (vol. 1698, p. 91-102). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7428-3_5
- Bettencourt, J. W., McLaury, A. R., Limberg, A. K., Vargas-Hernandez, J. S., Bayram, B., Owen, A. R., Berry, D. J., Sanchez-Sotelo, J., Morrey, M. E., Van Wijnen, A. J. et Abdel, M. P. (2020). Total protein staining is superior to classical or tissue-specific protein staining for standardization of protein biomarkers in heterogeneous tissue samples. *Gene Reports*, 19, 100641. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100641>
- Black, J. Dj. et Tadros, B. J. (2020). Bone structure: from cortical to calcium. *Orthopaedics and Trauma*, 34(3), 113-119. <https://doi.org/10.1016/j.mporth.2020.03.002>
- Bolamperti, S., Villa, I. et Rubinacci, A. (2022). Bone remodeling: an operational process ensuring survival and bone mechanical competence. *Bone Research*, 10(1), 48. <https://doi.org/10.1038/s41413-022-00219-8>
- Boskey, A. L. (2013). Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. *BoneKEy Reports*, 2. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2013.181>
- Bravo-Cordero, J. J., Magalhaes, M. A. O., Eddy, R. J., Hodgson, L. et Condeelis, J. (2013). Functions of cofilin in cell locomotion and invasion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(7), 405-415. <https://doi.org/10.1038/nrm3609>
- Burr, D. B. (2019). Bone Morphology and Organization. Dans *Basic and Applied Bone Biology* (p. 3-26). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813259-3.00001-4>

- Calderwood, D. A. et Ginsberg, M. H. (2003). Talin forges the links between integrins and actin. *Nature Cell Biology*, 5(8), 694-696. <https://doi.org/10.1038/ncb0803-694>
- Carrasco-Pozo, C., Tan, K. N. et Avery, V. M. (2020). Hemin Prevents Increased Glycolysis in Macrophages upon Activation: Protection by Microbiota-Derived Metabolites of Polyphenols. *Antioxidants*, 9(11), 1109. <https://doi.org/10.3390/antiox9111109>
- Chen, Q., Liu, K., Robinson, A. R., Clauson, C. L., Blair, H. C., Robbins, P. D., Niedernhofer, L. J. et Ouyang, H. (2013). DNA damage drives accelerated bone aging via an NF- κ B-dependent mechanism. *Journal of Bone and Mineral Research*, 28(5), 1214-1228. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1851>
- Chiabrando, D., Vinchi, F., Fiorito, V., Mercurio, S. et Tolosano, E. (2014). Heme in pathophysiology: a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes. *Frontiers in Pharmacology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00061>
- Chou, A. C. et Fitch, C. D. (1981). Mechanism of hemolysis induced by ferriprotoporphyrin IX. *Journal of Clinical Investigation*, 68(3), 672-677. <https://doi.org/10.1172/JCI110302>
- Coló, G. P., Schweitzer, K., Oresti, G. M., Alonso, E. G., Chávez, L. F., Mascaró, M., Giorgi, G., Curino, A. C. et Facchinetti, M. M. (2023). Proteomic analysis of the effect of hemin in breast cancer. *Scientific Reports*, 13(1), 10091. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-35125-4>
- Consonni, F. M., Incerti, M., Bertolotti, M., Ballerini, G., Garlatti, V. et Sica, A. (2024). Heme catabolism and heme oxygenase-1-expressing myeloid cells in pathophysiology. *Frontiers in Immunology*, 15, 1433113. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1433113>
- Corrons, J. L. V., Casafont, L. B. et Frasnado, E. F. (2021). Concise review: how do red blood cells born, live, and die? *Annals of Hematology*, 100(10), 2425-2433. <https://doi.org/10.1007/s00277-021-04575-z>
- Courtemanche, N. (2018). Mechanisms of formin-mediated actin assembly and dynamics. *Biophysical Reviews*, 10(6), 1553-1569. <https://doi.org/10.1007/s12551-018-0468-6>
- Cramer, L. P., Siebert, M. et Mitchison, T. J. (1997). Identification of Novel Graded Polarity Actin Filament Bundles in Locomoting Heart Fibroblasts: Implications for the Generation of Motile Force. *The Journal of Cell Biology*, 136(6), 1287-1305. <https://doi.org/10.1083/jcb.136.6.1287>
- Dallas, S. L. et Bonewald, L. F. (2010). Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1192, 437-443. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05246.x>
- Daponte, V., Henke, K. et Drissi, H. (2024). Current perspectives on the multiple roles of osteoclasts: Mechanisms of osteoclast-osteoblast communication and potential clinical implications. *eLife*, 13, e95083. <https://doi.org/10.7554/eLife.95083>
- Das, D., Tarafdar, P. K. et Chakrabarti, A. (2018). Structure - activity relationship of heme and its analogues in membrane damage and inhibition of fusion. *FEBS Letters*, 592(14), 2458-2465. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13165>

- Delanote, V., Vandekerckhove, J. et Gettemans, J. (2005). Plastins: versatile modulators of actin organization in (patho)physiological cellular processes. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26(7), 769-779. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2005.00145.x>
- Desoutter, J., Mentaverri, R., Brazier, M. et Kamel, S. (2012). Le remodelage osseux normal et pathologique. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2012(446), 33-42. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(12\)71733-1](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(12)71733-1)
- Destro Bisol, G. (1999). Genetic resistance to malaria, oxidative stress and hemoglobin oxidation. *Parassitologia*, 41(1-3), 203-204.
- Dominguez, R. et Holmes, K. C. (2011). Actin Structure and Function. *Annual Review of Biophysics*, 40(1), 169-186. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-042910-155359>
- Duvigneau, J. C., Esterbauer, H. et Kozlov, A. V. (2019). Role of Heme Oxygenase as a Modulator of Heme-Mediated Pathways. *Antioxidants*, 8(10), 475. <https://doi.org/10.3390/antiox8100475>
- Dyche Mullins, R. et Pollard, T. D. (1999). Structure and function of the Arp2/3 complex. *Current Opinion in Structural Biology*, 9(2), 244-249. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(99\)80034-7](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(99)80034-7)
- Edwards, D. F., Miller, C. J., Quintana - Martinez, A., Wright, C. S., Prideaux, M., Atkins, G. J., Thompson, W. R. et Clinkenbeard, E. L. (2021). Differential Iron Requirements for Osteoblast and Adipocyte Differentiation. *JBMR Plus*, 5(9), e10529. <https://doi.org/10.1002/jbm4.10529>
- Edwards, M., Zwolak, A., Schafer, D. A., Sept, D., Dominguez, R. et Cooper, J. A. (2014). Capping protein regulators fine-tune actin assembly dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(10), 677-689. <https://doi.org/10.1038/nrm3869>
- Faust, J. J., Balabiyev, A., Heddleston, J. M., Podolnikova, N. P., Baluch, D. P., Chew, T.-L. et Ugarova, T. P. (2019). An actin-based protrusion originating from a podosome-enriched region initiates macrophage fusion. *Molecular Biology of the Cell*, 30(17), 2254-2267. <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-01-0009>
- Flegel, W. A. (2015). Pathogenesis and mechanisms of antibody-mediated hemolysis: ANTIBODY-MEDIATED HEMOLYSIS. *Transfusion*, 55(S2), S47-S58. <https://doi.org/10.1111/trf.13147>
- Flores-Silva, R., Sasso, G. R. da S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J. et Cerri, P. S. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International*, 2015, 1-17. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>
- Franz, C. M., Jones, G. E. et Ridley, A. J. (2002). Cell Migration in Development and Disease. *Developmental Cell*, 2(2), 153-158. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00120-X](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00120-X)
- Fujita, T., Azuma, Y., Fukuyama, R., Hattori, Y., Yoshida, C., Koida, M., Ogita, K. et Komori, T. (2004). Runx2 induces osteoblast and chondrocyte differentiation and enhances their migration by coupling with PI3K-Akt signaling. *The Journal of Cell Biology*, 166(1), 85-95. <https://doi.org/10.1083/jcb.200401138>

- Funes, S. C., Rios, M., Fernández-Fierro, A., Covián, C., Bueno, S. M., Riedel, C. A., Mackern-Oberti, J. P. et Kalergis, A. M. (2020). Naturally Derived Heme-Oxygenase 1 Inducers and Their Therapeutic Application to Immune-Mediated Diseases. *Frontiers in Immunology*, 11, 1467. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01467>
- Gardeta, S. R., García-Cuesta, E. M., D'Agostino, G., Soler Palacios, B., Quijada-Freire, A., Lucas, P., Bernardino De La Serna, J., Gonzalez-Riano, C., Barbas, C., Rodríguez-Frade, J. M. et Mellado, M. (2022). Sphingomyelin Depletion Inhibits CXCR4 Dynamics and CXCL12-Mediated Directed Cell Migration in Human T Cells. *Frontiers in Immunology*, 13, 925559. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.925559>
- Gaudreault, V., Wirbel, J., Jardim, A., Rohrbach, P. et Scorza, T. (2015). Red Blood Cells Preconditioned with Hemin Are Less Permissive to Plasmodium Invasion In Vivo and In Vitro. *PLOS ONE*, 10(10), e0140805. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140805>
- Geurtzen, K., Knopf, F., Wehner, D., Huitema, L. F. A., Schulte-Merker, S. et Weidinger, G. (2014). Mature osteoblasts dedifferentiate in response to traumatic bone injury in the zebrafish fin and skull. *Development*, 141(11), 2225-2234. <https://doi.org/10.1242/dev.105817>
- Giri, R. P., Mukhopadhyay, M. K., Basak, U. K., Chakrabarti, A., Sanyal, M. K., Runge, B. et Murphy, B. M. (2018). Continuous Uptake or Saturation—Investigation of Concentration and Surface-Packing-Specific Hemin Interaction with Lipid Membranes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 122(30), 7547-7554. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b03327>
- Giudice, V. et Selleri, C. (2022). Aplastic anemia: Pathophysiology. *Seminars in Hematology*, 59(1), 13-20. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2021.12.002>
- Glatzel, D. K., Koeberle, A., Pein, H., Löser, K., Stark, A., Keksel, N., Werz, O., Müller, R., Bischoff, I. et Fürst, R. (2018). Acetyl-CoA carboxylase 1 regulates endothelial cell migration by shifting the phospholipid composition. *Journal of Lipid Research*, 59(2), 298-311. <https://doi.org/10.1194/jlr.M080101>
- Gojova, A. et Barakat, A. I. (2005). Vascular endothelial wound closure under shear stress: role of membrane fluidity and flow-sensitive ion channels. *Journal of Applied Physiology*, 98(6), 2355-2362. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01136.2004>
- Goldstein, A., Hannappel, E. et Kleinman, H. (2005). Thymosin β : actin-sequestering protein moonlights to repair injured tissues. *Trends in Molecular Medicine*, 11(9), 421-429. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2005.07.004>
- Grada, A., Otero-Vinas, M., Prieto-Castrillo, F., Obagi, Z. et Falanga, V. (2017). Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(2), e11-e16. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.11.020>
- Gurevitch, O. et Slavin, S. (2006). The hematological etiology of osteoporosis. *Medical Hypotheses*, 67(4), 729-735. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2006.03.051>
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton. *Science*, 279(5350), 509-514. <https://doi.org/10.1126/science.279.5350.509>

- Hall, V. et Avulakunta, I. D. (2023). Hemolytic Diseases of the Newborn. Dans *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557423/>
- Hanna, S. et El-Sibai, M. (2013). Signaling networks of Rho GTPases in cell motility. *Cellular Signalling*, 25(10), 1955-1961. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.04.009>
- Hayashi, S., Omata, Y., Sakamoto, H., Higashimoto, Y., Hara, T., Sagara, Y. et Noguchi, M. (2004). Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene*, 336(2), 241-250. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.04.002>
- Heidings, J. B., Demosthene, B., Merlino, T. R., Castaneda, N. et Kang, E. H. (2020). Gelsolin-mediated actin filament severing in crowded environments. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 532(4), 548-554. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.08.041>
- Heremans, H., Billiau, A., Cassiman, J. J., Mulier, J. C. et De Somer, P. (1978). In Vitro Cultivation of Human Tumor Tissues II. Morphological and Virological Characterization of Three Cell Lines. *Oncology*, 35(6), 246-252. <https://doi.org/10.1159/000225298>
- Hernigou, P., Bachir, D. et Galacteros, F. (2003). THE NATURAL HISTORY OF SYMPTOMATIC OSTEONECROSIS IN ADULTS WITH SICKLE-CELL DISEASE: *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, 85(3), 500-504. <https://doi.org/10.2106/00004623-200303000-00016>
- Higdon, A. N., Benavides, G. A., Chacko, B. K., Ouyang, X., Johnson, M. S., Landar, A., Zhang, J. et Darley-Usmar, V. M. (2012). Hemin causes mitochondrial dysfunction in endothelial cells through promoting lipid peroxidation: the protective role of autophagy. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 302(7), H1394-H1409. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00584.2011>
- Hitchcock-DeGregori, S. E., Song, Y. et Greenfield, N. J. (2002). Functions of Tropomyosin's Periodic Repeats[†]. *Biochemistry*, 41(50), 15036-15044. <https://doi.org/10.1021/bi026519k>
- Homan, R. A., Jadhav, A. M., Conway, L. P. et Parker, C. G. (2022). A Chemical Proteomic Map of Heme-Protein Interactions. *Journal of the American Chemical Society*, 144(33), 15013-15019. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c06104>
- Igarashi, J., Murase, M., Iizuka, A., Pichierri, F., Martinkova, M. et Shimizu, T. (2008). Elucidation of the Heme Binding Site of Heme-regulated Eukaryotic Initiation Factor 2 α Kinase and the Role of the Regulatory Motif in Heme Sensing by Spectroscopic and Catalytic Studies of Mutant Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 283(27), 18782-18791. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801400200>
- Ikewaki, N., Yamada, A. et Inoko, H. (2003). Depolymerization of Actin Filament by Cytochalasin E Induces Interleukin - 8 Production and Up - Regulates CD54 in the HeLa Epithelial Cell Line. *Microbiology and Immunology*, 47(10), 775-783. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2003.tb03435.x>
- Imoto, S., Sawamura, T., Shibuya, Y., Kono, M., Ohbuchi, A., Suzuki, T., Mizokoshi, Y. et Saigo, K. (2022). Labile iron, ROS, and cell death are prominently induced by haemin, but not by non-transferrin-

- bound iron. *Transfusion and Apheresis Science*, 61(2), 103319.
<https://doi.org/10.1016/j.transci.2021.103319>
- Islam, M., Jones, S. et Ellis, I. (2023). Role of Akt/Protein Kinase B in Cancer Metastasis. *Biomedicines*, 11(11), 3001. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11113001>
- Jarolim, P., Lahav, M., Liu, S. et Palek, J. (1990). Effect of hemoglobin oxidation products on the stability of red cell membrane skeletons and the associations of skeletal proteins: correlation with a release of hemin. *Blood*, 76(10), 2125-2131.
<https://doi.org/10.1182/blood.V76.10.2125.bloodjournal76102125>
- Jiang, Z., Wang, H., Qi, G., Jiang, C., Chen, K. et Yan, Z. (2022). Iron overload - induced ferroptosis of osteoblasts inhibits osteogenesis and promotes osteoporosis: An in vitro and in vivo study. *IUBMB Life*, 74(11), 1052-1069. <https://doi.org/10.1002/iub.2656>
- Jilka, R. L. (2013). The Relevance of Mouse Models for Investigating Age-Related Bone Loss in Humans. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 68(10), 1209-1217. <https://doi.org/10.1093/gerona/glt046>
- Jones, S. J. et Boyde, A. (1977). The migration of osteoblasts. *Cell and Tissue Research*, 184(2).
<https://doi.org/10.1007/BF00223067>
- Juan, C. A., Pérez De La Lastra, J. M., Plou, F. J. et Pérez-Lebeña, E. (2021). The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4642.
<https://doi.org/10.3390/ijms22094642>
- Kalfa, T. A. (2016). Warm antibody autoimmune hemolytic anemia. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 2016(1), 690-697. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2016.1.690>
- Kaur, P., Nagar, S., Bhagwat, M., Uddin, M., Zhu, Y., Vancurova, I. et Vancura, A. (2021). Activated heme synthesis regulates glycolysis and oxidative metabolism in breast and ovarian cancer cells. *PLOS ONE*, 16(11), e0260400. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260400>
- Kaushik, V., Hanschmann, E.-M., Brännert, D., Prerna, K., Anand, B. G., Sharma, P. K., Kar, K. et Goyal, P. (2021, 28 novembre). *Computational and biochemical analyses reveal that cofilin-2 self assembles into amyloid-like structures and promotes the aggregation of other proteinaceous species: Pathogenic relevance to myopathies* [preprint]. *Biochemistry*.
<https://doi.org/10.1101/2021.11.27.470221>
- Kelsch, D. J. et Tootle, T. L. (2018). Nuclear Actin: From Discovery to Function. *The Anatomical Record*, 301(12), 1999-2013. <https://doi.org/10.1002/ar.23959>
- Kenkre, J. et Bassett, J. (2018). The bone remodelling cycle. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine*, 55(3), 308-327. <https://doi.org/10.1177/0004563218759371>
- Kennedy, O. D., Herman, B. C., Laudier, D. M., Majeska, R. J., Sun, H. B. et Schaffler, M. B. (2012). Activation of resorption in fatigue-loaded bone involves both apoptosis and active pro-

- osteoclastogenic signaling by distinct osteocyte populations. *Bone*, 50(5), 1115-1122. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2012.01.025>
- Kim, J.-M., Lin, C., Stavre, Z., Greenblatt, M. B. et Shim, J.-H. (2020). Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells*, 9(9), 2073. <https://doi.org/10.3390/cells9092073>
- Klamt, F., Zdanov, S., Levine, R. L., Pariser, A., Zhang, Y., Zhang, B., Yu, L.-R., Veenstra, T. D. et Shacter, E. (2009). Oxidant-induced apoptosis is mediated by oxidation of the actin-regulatory protein cofilin. *Nature Cell Biology*, 11(10), 1241-1246. <https://doi.org/10.1038/ncb1968>
- Kostyukova, A. S., Choy, A. et Rapp, B. A. (2006). Tropomodulin Binds Two Tropomyosins: A Novel Model for Actin Filament Capping. *Biochemistry*, 45(39), 12068-12075. <https://doi.org/10.1021/bi060899i>
- Kozlova, E., Chernysh, A., Manchenko, E., Sergunova, V. et Moroz, V. (2018). Nonlinear Biomechanical Characteristics of Deep Deformation of Native RBC Membranes in Normal State and under Modifier Action. *Scanning*, 2018, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2018/1810585>
- Kozlova, E., Chernysh, A., Moroz, V., Gudkova, O., Sergunova, V. et Kuzovlev, A. (2014). Transformation of membrane nanosurface of red blood cells under hemin action. *Scientific Reports*, 4(1), 6033. <https://doi.org/10.1038/srep06033>
- Krishnan, K. et Moens, P. D. J. (2009). Structure and functions of profilins. *Biophysical Reviews*, 1(2), 71-81. <https://doi.org/10.1007/s12551-009-0010-y>
- Kuhn, V., Diederich, L., Keller, T. C. S., Kramer, C. M., Lückstädt, W., Panknin, C., Suvorava, T., Isakson, B. E., Kelm, M. et Cortese-Krott, M. M. (2017). Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia. *Antioxidants & Redox Signaling*, 26(13), 718-742. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6954>
- Kumar, S. et Bandyopadhyay, U. (2005). Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicology Letters*, 157(3), 175-188. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.03.004>
- Lambert, C., Schmidt, K., Karger, M., Stadler, M., Stradal, T. E. B. et Rottner, K. (2023). Cytochalasins and Their Impact on Actin Filament Remodeling. *Biomolecules*, 13(8), 1247. <https://doi.org/10.3390/biom13081247>
- Layer, G. (2020). Radical S-Adenosylmethionine Enzymes in Heme Biosynthesis. Dans *Comprehensive Natural Products III* (p. 349-363). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14805-X>
- Lee, H. C., Hon, T., Lan, C. et Zhang, L. (2003). Structural environment dictates the biological significance of heme-responsive motifs and the role of Hsp90 in the activation of the heme activator protein Hap1. *Molecular and Cellular Biology*, 23(16), 5857-5866. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.16.5857-5866.2003>
- Lin, T., Tang, C., Hung, S., Liu, S., Lin, Y., Fu, W. et Yang, R. (2010). Upregulation of heme oxygenase - 1 inhibits the maturation and mineralization of osteoblasts. *Journal of Cellular Physiology*, 222(3), 757-768. <https://doi.org/10.1002/jcp.22008>

- Liu, M., Hassana, S. et Stiles, J. K. (2016). Heme-mediated apoptosis and fusion damage in BeWo trophoblast cells. *Scientific Reports*, 6(1), 36193. <https://doi.org/10.1038/srep36193>
- Liu, S. C., Zhai, S., Lawler, J. et Palek, J. (1985). Hemin-mediated dissociation of erythrocyte membrane skeletal proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 260(22), 12234-12239. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)39015-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)39015-4)
- Lonergan, G. J., Cline, D. B. et Abbondanzo, S. L. (2001). Sick Cell Anemia. *RadioGraphics*, 21(4), 971-994. <https://doi.org/10.1148/radiographics.21.4.g01j123971>
- Maloy, A., Alexander, S., Andreas, A., Nyunoya, T. et Chandra, D. (2022). Stain-Free total-protein normalization enhances the reproducibility of Western blot data. *Analytical Biochemistry*, 654, 114840. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114840>
- Maninova, M., Caslavsky, J. et Vomastek, T. (2017). The assembly and function of perinuclear actin cap in migrating cells. *Protoplasma*, 254(3), 1207-1218. <https://doi.org/10.1007/s00709-017-1077-0>
- Martínková, M., Kitanishi, K. et Shimizu, T. (2013). Heme-based globin-coupled oxygen sensors: linking oxygen binding to functional regulation of diguanylate cyclase, histidine kinase, and methyl-accepting chemotaxis. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(39), 27702-27711. <https://doi.org/10.1074/jbc.R113.473249>
- Martins, R., Maier, J., Gorki, A.-D., Huber, K. V. M., Sharif, O., Starkl, P., Saluzzo, S., Quattrone, F., Gawish, R., Lakovits, K., Aichinger, M. C., Radic-Sarikas, B., Lardeau, C.-H., Hladik, A., Korosec, A., Brown, M., Vaahomeri, K., Duggan, M., Kerjaschki, D., ... Knapp, S. (2016). Heme drives hemolysis-induced susceptibility to infection via disruption of phagocyte functions. *Nature Immunology*, 17(12), 1361-1372. <https://doi.org/10.1038/ni.3590>
- Mccoubrey, W. K., Huang, T. J. et Maines, M. D. (1997). Isolation and Characterization of a cDNA from the Rat Brain that Encodes Hemoprotein Heme Oxygenase - 3. *European Journal of Biochemistry*, 247(2), 725-732. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00725.x>
- Mebius, R. E. et Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nature Reviews Immunology*, 5(8), 606-616. <https://doi.org/10.1038/nri1669>
- Mendonça, R., Silveira, A. A. A. et Conran, N. (2016). Red cell DAMPs and inflammation. *Inflammation Research*, 65(9), 665-678. <https://doi.org/10.1007/s00011-016-0955-9>
- Messer, J. G., Kilbarger, A. K., Erikson, K. M. et Kipp, D. E. (2009). Iron overload alters iron-regulatory genes and proteins, down-regulates osteoblastic phenotype, and is associated with apoptosis in fetal rat calvaria cultures. *Bone*, 45(5), 972-979. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.07.073>
- Mohamed, A. M. (2008). An overview of bone cells and their regulating factors of differentiation. *The Malaysian journal of medical sciences: MJMS*, 15(1), 4-12.
- Moraes, J. A., Barcellos-de-Souza, P., Rodrigues, G., Nascimento-Silva, V., Silva, S. V., Assreuy, J., Arruda, M. A. et Barja-Fidalgo, C. (2012). Heme modulates smooth muscle cell proliferation and migration via NADPH oxidase: A counter-regulatory role for heme oxygenase system. *Atherosclerosis*, 224(2), 394-400. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.07.043>

- Moreau, R., Tshikudi Malu, D., Dumais, M., Dalko, E., Gaudreault, V., Roméro, H., Martineau, C., Kevorkova, O., Dardon, J. S., Dodd, E. L., Bohle, D. S. et Scorza, T. (2012). Alterations in Bone and Erythropoiesis in Hemolytic Anemia: Comparative Study in Bled, Phenylhydrazine-Treated and Plasmodium-Infected Mice. *PLoS ONE*, 7(9), e46101. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046101>
- Morgan, W. T., Heng Liem, H., Sutor, R. P. et Muller-Eberhard, U. (1976). Transfer of heme from heme-albumin to hemopexin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 444(2), 435-445. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(76\)90387-1](https://doi.org/10.1016/0304-4165(76)90387-1)
- Muñoz-Sánchez, J. et Chánez-Cárdenas, M. E. (2014). A Review on Hemoxygenase-2: Focus on Cellular Protection and Oxygen Response. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 1-16. <https://doi.org/10.1155/2014/604981>
- Nakahama, K. (2010). Cellular communications in bone homeostasis and repair. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(23), 4001-4009. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0479-3>
- Nakano, K., Kanai-Azuma, M., Kanai, Y., Moriyama, K., Yazaki, K., Hayashi, Y. et Kitamura, N. (2003). Cofilin phosphorylation and actin polymerization by NRK/NESK, a member of the germinal center kinase family. *Experimental Cell Research*, 287(2), 219-227. [https://doi.org/10.1016/S0014-4827\(03\)00136-8](https://doi.org/10.1016/S0014-4827(03)00136-8)
- Neftullaeva, A. H., Velibegov, I. N., Kurbanova, K. N., Magomedalieva, M. A., Alieva, A. A. et Adoi, S. Z. (2023). The Role of Atomic Force Microscopy in the Study of the Properties of the Erythrocyte Membrane. *Archives of Pharmacy Practice*, 14(3), 10-13. <https://doi.org/10.51847/KiR6GgWSN2>
- Perisano, C., Marzetti, E., Spinelli, M. S., Callà, C. A. M., Graci, C. et Maccauro, G. (2012). Physiopathology of Bone Modifications in β -Thalassemia. *Anemia*, 2012, 1-5. <https://doi.org/10.1155/2012/320737>
- Petrache, I., Otterbein, L. E., Alam, J., Wiegand, G. W. et Choi, A. M. K. (2000). Heme oxygenase-1 inhibits TNF- α -induced apoptosis in cultured fibroblasts. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 278(2), L312-L319. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2000.278.2.L312>
- Petrie, R. J., Doyle, A. D. et Yamada, K. M. (2009). Random versus directionally persistent cell migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(8), 538-549. <https://doi.org/10.1038/nrm2729>
- Pollard, T. D. (2016). Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(8), a018226. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018226>
- Pollard, T. D. et Cooper, J. A. (2009). Actin, a Central Player in Cell Shape and Movement. *Science*, 326(5957), 1208-1212. <https://doi.org/10.1126/science.1175862>
- Pootrakul, P., Hungsprenges, S., Fucharoen, S., Baylink, D., Thompson, E., English, E., Lee, M., Burnell, J. et Finch, C. (1981). Relation between Erythropoiesis and Bone Metabolism in Thalassemia. *New England Journal of Medicine*, 304(24), 1470-1473. <https://doi.org/10.1056/NEJM198106113042406>

- Popow-Woźniak, A., Mazur, A. J., Mannherz, H. G., Malicka-Błaszkiwicz, M. et Nowak, D. (2012). Cofilin overexpression affects actin cytoskeleton organization and migration of human colon adenocarcinoma cells. *Histochemistry and Cell Biology*, 138(5), 725-736. <https://doi.org/10.1007/s00418-012-0988-2>
- Potter, J. R., Rivera, S., Young, P. G., Patterson, D. C., Namitz, K. E., Yennawar, N., Kincaid, J. R., Liu, Y. et Weinert, E. E. (2024). Heme pocket modulates protein conformation and diguanylate cyclase activity of a tetrameric globin coupled sensor. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 258, 112638. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2024.112638>
- Reiter, C. D., Wang, X., Tanus-Santos, J. E., Hogg, N., Cannon, R. O., Schechter, A. N. et Gladwin, M. T. (2002). Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nature Medicine*, 8(12), 1383-1389. <https://doi.org/10.1038/nm1202-799>
- Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Parsons, J. T. et Horwitz, A. R. (2003). Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. *Science*, 302(5651), 1704-1709. <https://doi.org/10.1126/science.1092053>
- Rodnick-Smith, M., Luan, Q., Liu, S.-L. et Nolen, B. J. (2016). Role and structural mechanism of WASP-triggered conformational changes in branched actin filament nucleation by Arp2/3 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(27). <https://doi.org/10.1073/pnas.1517798113>
- Ruggiero, C. et Lalli, E. (2021). Targeting the cytoskeleton against metastatic dissemination. *Cancer and Metastasis Reviews*, 40(1), 89-140. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09936-0>
- Ryter, S. W. (2021). Significance of Heme and Heme Degradation in the Pathogenesis of Acute Lung and Inflammatory Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5509. <https://doi.org/10.3390/ijms22115509>
- Sacerdoti, D., Olszanecki, R., Volti, G., Colombrita, C., Scapagnini, G. et Abraham, N. (2005). Heme Oxygenase Overexpression Attenuates Glucose-Mediated Oxidative Stress in Quiescent Cell Phase: Linking Heme to Hyperglycemia Complications. *Current Neurovascular Research*, 2(2), 103-111. <https://doi.org/10.2174/1567202053586802>
- Sahoo, N., Yang, K., Coburger, I., Bernert, A., Swain, S. M., Gessner, G., Kappl, R., Kühl, T., Imhof, D., Hoshi, T., Schönherr, R. et Heinemann, S. H. (2022). Intracellular heme is a potent inhibitor of the voltage-gated potassium channel Kv10.1. *Scientific Reports*, 12(1), 14645. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18975-2>
- Samstag, Y., John, I. et Wabnitz, G. H. (2013). Cofilin: a redox sensitive mediator of actin dynamics during T - cell activation and migration. *Immunological Reviews*, 256(1), 30-47. <https://doi.org/10.1111/imr.12115>
- Sánchez-Madrid, F. et Serrador, J. M. (2009). Bringing up the rear: defining the roles of the uropod. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(5), 353-359. <https://doi.org/10.1038/nrm2680>
- Saurin, J.-C. (2010). Exploration d'une anémie ferriprive. *La Presse Médicale*, 39(7-8), 794-798. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2010.03.008>

- Sayeed, M. S. B., Alhadidi, Q. et Shah, Z. A. (2017). Cofilin signaling in hemin-induced microglial activation and inflammation. *Journal of Neuroimmunology*, 313, 46-55. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.10.007>
- Schaer, D. J., Buehler, P. W., Alayash, A. I., Belcher, J. D. et Vercellotti, G. M. (2013). Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins. *Blood*, 121(8), 1276-1284. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-11-451229>
- Seetharaman, S. et Etienne-Manneville, S. (2020). Cytoskeletal Crosstalk in Cell Migration. *Trends in Cell Biology*, 30(9), 720-735. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.06.004>
- Segawa, K., Igarashi, K. et Murayama, K. (2022). The Cys - Pro motifs in the intrinsically disordered regions of the transcription factor BACH1 mediate distinct and overlapping functions upon heme binding. *FEBS Letters*, 596(12), 1576-1585. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14338>
- SenGupta, S., Parent, C. A. et Bear, J. E. (2021). The principles of directed cell migration. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 22(8), 529-547. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00366-6>
- Shaklai, N., Avissar, N., Rabizadeh, E. et Shaklai, M. (1986). Disintegration of red cell membrane cytoskeleton by hemin. *Biochemistry International*, 13(3), 467-477.
- Shaklai, N., Frayman, B., Fortier, N. et Snyder, M. (1987). Crosslinking of isolated cytoskeletal proteins with hemoglobin: a possible damage inflicted to the red cell membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 915(3), 406-414. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(87\)90027-6](https://doi.org/10.1016/0167-4838(87)90027-6)
- Shaklai, N., Shviro, Y., Rabizadeh, E. et Kirschner-Zilber, I. (1985). Accumulation and drainage of hemin in the red cell membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 821(2), 355-366. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(85\)90106-3](https://doi.org/10.1016/0005-2736(85)90106-3)
- Shen, J., Sheng, X., Chang, Z., Wu, Q., Wang, S., Xuan, Z., Li, D., Wu, Y., Shang, Y., Kong, X., Yu, L., Li, L., Ruan, K., Hu, H., Huang, Y., Hui, L., Xie, D., Wang, F. et Hu, R. (2014). Iron Metabolism Regulates p53 Signaling through Direct Heme-p53 Interaction and Modulation of p53 Localization, Stability, and Function. *Cell Reports*, 7(1), 180-193. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.02.042>
- Shenoy, G., Kheirabadi, S., Ataie, Z., Sahu, A. P., Palsa, K., Wade, Q., Khunsriraksakul, C., Khristov, V., Slagle - Webb, B., Lathia, J. D., Wang, H., Sheikhi, A. et Connor, J. R. (2023). Iron inhibits glioblastoma cell migration and polarization. *The FASEB Journal*, 37(12), e23307. <https://doi.org/10.1096/fj.202202157RR>
- Shi, L., Lin, C.-L., Su, C.-H., Lin, K.-C., Leong, K.-H., Wang, Y.-T. T., Kuo, C.-F. et Tsai, S.-Y. (2021). The Risk of Developing Osteoporosis in Hemolytic Anemia—What Aggravates the Bone Loss? *Journal of Clinical Medicine*, 10(15), 3364. <https://doi.org/10.3390/jcm10153364>
- Shimizu, T., Huang, D., Yan, F., Stranova, M., Bartosova, M., Fojtíková, V. et Martínková, M. (2015). Gaseous O₂, NO, and CO in Signal Transduction: Structure and Function Relationships of Heme-Based Gas Sensors and Heme-Redox Sensors. *Chemical Reviews*, 115(13), 6491-6533. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00018>

- Shimizu, T., Lengalova, A., Martínek, V. et Martínková, M. (2019). Heme: emergent roles of heme in signal transduction, functional regulation and as catalytic centres. *Chemical Society Reviews*, 48(24), 5624-5657. <https://doi.org/10.1039/C9CS00268E>
- Shirakawa, J., Ezura, Y., Moriya, S., Kawasaki, M., Yamada, T., Notomi, T., Nakamoto, T., Hayata, T., Miyawaki, A., Omura, K. et Noda, M. (2014). Migration Linked to FUCCI - Indicated Cell Cycle Is Controlled by PTH and Mechanical Stress. *Journal of Cellular Physiology*, 229(10), 1353-1358. <https://doi.org/10.1002/jcp.24605>
- Siddon, A. J. et Tormey, C. A. (2019). The chemical and laboratory investigation of hemolysis. Dans *Advances in Clinical Chemistry* (vol. 89, p. 215-258). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2018.12.006>
- Smith-Guzmán, N. E. (2015). The skeletal manifestation of malaria: An epidemiological approach using documented skeletal collections: The Skeletal Manifestation of Malaria. *American Journal of Physical Anthropology*, 158(4), 624-635. <https://doi.org/10.1002/ajpa.22819>
- Solar, I., Muller-Eberhard, U., Shviro, Y. et Shaklai, N. (1991). Long-term intercalation of residual hemin in erythrocyte membranes distorts the cell. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1062(1), 51-58. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(91\)90334-5](https://doi.org/10.1016/0005-2736(91)90334-5)
- S.R. Goodman (dir.). (2008). Chapter 3 - Cytoskeleton. Dans *Medical Cell Biology (Third Edition)* (p. 59-100). Elsevier inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370458-0.50008-6>
- Staehlke, S., Rebl, H. et Nebe, B. (2019). Phenotypic stability of the human MG - 63 osteoblastic cell line at different passages. *Cell Biology International*, 43(1), 22-32. <https://doi.org/10.1002/cbin.11073>
- Steer, K., Stavnychuk, M., Morris, M. et Komarova, S. V. (2017). Bone Health in Patients With Hematopoietic Disorders of Bone Marrow Origin: Systematic Review and Meta- Analysis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 32(4), 731-742. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3026>
- Su, Y., Luo, X., He, B.-C., Wang, Y., Chen, L., Zuo, G.-W., Liu, B., Bi, Y., Huang, J., Zhu, G.-H., He, Y., Kang, Q., Luo, J., Shen, J., Chen, J., Jin, X., Haydon, R. C., He, T.-C. et Luu, H. H. (2009). Establishment and characterization of a new highly metastatic human osteosarcoma cell line. *Clinical & Experimental Metastasis*, 26(7), 599-610. <https://doi.org/10.1007/s10585-009-9259-6>
- Svitkina, T. (2018). The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(1), a018267. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018267>
- Tanaka, K., Takeda, S., Mitsuoka, K., Oda, T., Kimura-Sakiyama, C., Maéda, Y. et Narita, A. (2018). Structural basis for cofilin binding and actin filament disassembly. *Nature Communications*, 9(1), 1860. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04290-w>
- Tanaka, M., Kikuchi, T., Uno, H., Okita, K., Kitanishi-Yumura, T. et Yumura, S. (2017). Turnover and flow of the cell membrane for cell migration. *Scientific Reports*, 7(1), 12970. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13438-5>

- Tang, D. D. et Gerlach, B. D. (2017). The roles and regulation of the actin cytoskeleton, intermediate filaments and microtubules in smooth muscle cell migration. *Respiratory Research*, 18(1), 54. <https://doi.org/10.1186/s12931-017-0544-7>
- Tang, X. D., Xu, R., Reynolds, M. F., Garcia, M. L., Heinemann, S. H. et Hoshi, T. (2003). Haem can bind to and inhibit mammalian calcium-dependent Slo1 BK channels. *Nature*, 425(6957), 531-535. <https://doi.org/10.1038/nature02003>
- Tanimura, S. et Takeda, K. (2017). ERK signalling as a regulator of cell motility. *The Journal of Biochemistry*, 162(3), 145-154. <https://doi.org/10.1093/jb/mvx048>
- Thiagarajan, P., Parker, C. J. et Prchal, J. T. (2021). How Do Red Blood Cells Die? *Frontiers in Physiology*, 12, 655393. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.655393>
- Thiel, A., Reumann, M. K., Boskey, A., Wischmann, J., von Eisenhart-Rothe, R. et Mayer-Kuckuk, P. (2018). Osteoblast migration in vertebrate bone. *Biological Reviews*, 93(1), 350-363. <https://doi.org/10.1111/brv.12345>
- Thompson, A. P., Bitsina, C., Gray, J. L., Von Delft, F. et Brennan, P. E. (2021). RHO to the DOCK for GDP disembarking: Structural insights into the DOCK GTPase nucleotide exchange factors. *Journal of Biological Chemistry*, 296, 100521. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100521>
- Toshima, J., Toshima, J. Y., Takeuchi, K., Mori, R. et Mizuno, K. (2001). Cofilin Phosphorylation and Actin Reorganization Activities of Testicular Protein Kinase 2 and Its Predominant Expression in Testicular Sertoli Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276(33), 31449-31458. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102988200>
- Turner, J., Parsi, M. et Badireddy, M. (2025). Anemia. Dans *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499994/>
- Vallelian, F., Buehler, P. W. et Schaer, D. J. (2022). Hemolysis, free hemoglobin toxicity, and scavenger protein therapeutics. *Blood*, 140(17), 1837-1844. <https://doi.org/10.1182/blood.2022015596>
- Vives, V., Laurin, M., Cres, G., Larrousse, P., Morichaud, Z., Noel, D., Côté, J.-F. et Blangy, A. (2011). The Rac1 exchange factor Dock5 is essential for bone resorption by osteoclasts. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26(5), 1099-1110. <https://doi.org/10.1002/jbmr.282>
- Wang, J., Lee, Y., Chang, P. et Chau, L. (2009). Hemin promotes proliferation and differentiation of endothelial progenitor cells via activation of AKT and ERK. *Journal of Cellular Physiology*, 219(3), 617-625. <https://doi.org/10.1002/jcp.21711>
- Wang, Y., Brooks, P. J., Jang, J. J., Silver, A. S., Arora, P. D., McCulloch, C. A. et Glogauer, M. (2015). Role of actin filaments in fusopod formation and osteoclastogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1853(7), 1715-1724. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.04.001>
- Watanabe-Matsui, M., Matsumoto, T., Matsui, T., Ikeda-Saito, M., Muto, A., Murayama, K. et Igarashi, K. (2015). Heme binds to an intrinsically disordered region of Bach2 and alters its conformation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 565, 25-31. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.11.005>

- Wijayanti, N., Kietzmann, T. et Immenschuh, S. (2005). Heme Oxygenase-1 Gene Activation by the NAD(P)H Oxidase Inhibitor 4-(2-Aminoethyl) Benzenesulfonyl Fluoride via a Protein Kinase B, p38-dependent Signaling Pathway in Monocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 280(23), 21820-21829. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502943200>
- Wioland, H., Guichard, B., Senju, Y., Myram, S., Lappalainen, P., Jégou, A. et Romet-Lemonne, G. (2017). ADF/Cofilin Accelerates Actin Dynamics by Severing Filaments and Promoting Their Depolymerization at Both Ends. *Current Biology*, 27(13), 1956-1967.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.048>
- Wu, B., Wu, Y. et Tang, W. (2019). Heme Catabolic Pathway in Inflammation and Immune Disorders. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 825. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00825>
- Yeoh, S., Pope, B., Mannherz, H. G. et Weeds, A. (2002). Determining the differences in actin binding by human ADF and cofilin 1 Edited by J. Karn. *Journal of Molecular Biology*, 315(4), 911-925. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5280>
- Yesilkanal, A. E., Yang, D., Valdespino, A., Tiwari, P., Sabino, A. U., Nguyen, L. C., Lee, J., Xie, X.-H., Sun, S., Dann, C., Robinson-Mailman, L., Steinberg, E., Stuhlmiller, T., Frankenberger, C., Goldsmith, E., Johnson, G. L., Ramos, A. F. et Rosner, M. R. (2021). Limited inhibition of multiple nodes in a driver network blocks metastasis. *eLife*, 10, e59696. <https://doi.org/10.7554/eLife.59696>
- Yeung, T., Georges, P. C., Flanagan, L. A., Marg, B., Ortiz, M., Funaki, M., Zahir, N., Ming, W., Weaver, V. et Janmey, P. A. (2005). Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 60(1), 24-34. <https://doi.org/10.1002/cm.20041>
- Zarjou, A., Jeney, V., Arosio, P., Poli, M., Zavaczki, E., Balla, G. et Balla, J. (2010). Ferritin ferroxidase activity: A potent inhibitor of osteogenesis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 25(1), 164-172. <https://doi.org/10.1359/jbmr.091002>
- Zenke-Kawasaki, Y., Dohi, Y., Katoh, Y., Ikura, T., Ikura, M., Asahara, T., Tokunaga, F., Iwai, K. et Igarashi, K. (2007). Heme Induces Ubiquitination and Degradation of the Transcription Factor Bach1. *Molecular and Cellular Biology*, 27(19), 6962-6971. <https://doi.org/10.1128/MCB.02415-06>
- Zhang, R., Zhang, C., Zhao, Q. et Li, D. (2013). Spectrin: Structure, function and disease. *Science China Life Sciences*, 56(12), 1076-1085. <https://doi.org/10.1007/s11427-013-4575-0>
- Zhao, H., Hakala, M. et Lappalainen, P. (2010). ADF/cofilin binds phosphoinositides in a multivalent manner to act as a PIP(2)-density sensor. *Biophysical Journal*, 98(10), 2327-2336. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.01.046>
- Zhou, R., Guo, Q., Xiao, Y., Guo, Q., Huang, Y., Li, C. et Luo, X. (2021a). Endocrine role of bone in the regulation of energy metabolism. *Bone Research*, 9(1), 25. <https://doi.org/10.1038/s41413-021-00142-4>
- Zhou, X., Yuan, W., Xiong, X., Zhang, Z., Liu, J., Zheng, Y., Wang, J. et Liu, J. (2021b). HO-1 in Bone Biology: Potential Therapeutic Strategies for Osteoporosis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 791585. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.791585>

Ziberna, L., Martelanc, M., Franko, M. et Passamonti, S. (2016). Bilirubin is an Endogenous Antioxidant in Human Vascular Endothelial Cells. *Scientific Reports*, 6(1), 29240.
<https://doi.org/10.1038/srep29240>