



HAL
open science

**Histophysiologie du microenvironnement osseux
conditionné par l'intoxication au tetradifon et par les
métastases osseuses ostéolytiques induites par cellules
Wlaker 256/B**

Riadh Badraoui

► **To cite this version:**

Riadh Badraoui. Histophysiologie du microenvironnement osseux conditionné par l'intoxication au tetradifon et par les métastases osseuses ostéolytiques induites par cellules Wlaker 256/B. Physiologie [q-bio.TO]. Université d'Angers, 2009. Français. NNT : . tel-00534399

HAL Id: tel-00534399

<https://theses.hal.science/tel-00534399>

Submitted on 9 Nov 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ D'ANGERS
UNIVERSITÉ DE SFAX

Année 2009
N° d'ordre : 914

Histophysiologie du microenvironnement osseux conditionné par l'intoxication au tetradifon et par les métastases osseuses ostéolytiques induites par cellules Wlaker 256/B

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité : Physiologie et physiopathologie humaine

ÉCOLE DOCTORALE D'ANGERS

Présentée et soutenue publiquement

le : 05 Février 2009

à : Sfax

par : Riadh BADRAOUI

Devant le jury ci-dessous :

Abdelfattah EL-FEKI, président du jury, Professeur des Universités, Sfax

Eric AGUADO, rapporteur, Maître de Conférence Universitaire, Nantes

Abdelhamid CHAOUCH, rapporteur, Professeur des Universités, Monastir

Maurice AUDRAN, examinateur, Professeur des Universités, Angers

Directeur de thèse : Tarek REBAI, Professeur des Universités, Sfax

Directeur de thèse : Daniel CHAPPARD, Professeur des Universités, Angers

INSERM, U 922
Laboratoire d'Histologie-Embryologie, UFR Médecine
1, rue Haute de Reculée
49045 Angers



THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité : Physiologie et physiopathologie humaine

Histo-physiologie du microenvironnement osseux
conditionné par l'intoxication au tetradifon et par les
métastases osseuses ostéolytiques induites par cellules
Walker 256/B

Présentée et soutenue le 05 Février 2009 par :

Riadh BADRAOUI

Devant le jury ci-dessous :

Abdelfattah EL-FEKI
Abdelhamid CHAOUCH
Eric AGUADO
Maurice AUDRAN
Daniel CHAPPARD :
Tarek REBAI :

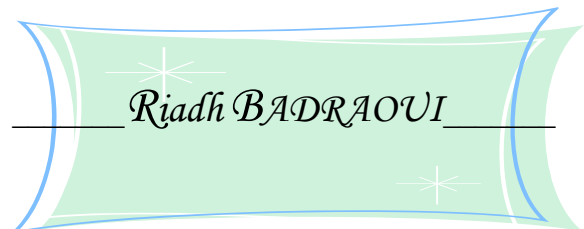
Président ;
Rapporteur ;
Rapporteur ;
Examineur ;
Directeur de thèse ;
Directeur de thèse ;

Professeur, Sfax
Professeur, Monastir
Professeur, Nantes
Professeur, Angers
Professeur, Angers
Professeur, Sfax

Dédicaces

Je dédie ce travail :

- *A mes parents Abdelhafidh & Mabrouka. Que ce travail vous est particulièrement dédié. Je ne saurais vous exprimer toute ma reconnaissance pour vos sacrifices consentis, votre grand amour, votre soutien moral que vous n'avez cessé de me prodiguer. Que dieu vous protège & vous offre une longue vie.*
- *A ma femme Selma. Que ce travail soit l'expression et le témoignage de mon profond amour et respect.*
- *A mon frère Adel & son épouse Aicha ainsi que ses enfants. Que ce travail soit l'expression de ma grande affection et un témoignage de mon profond amour.*
- *A mes frères & sœurs. Je souhaite à chacun de vous la réussite dans ce qu'il entreprend.*
- *A tous mes ami(e)s, collègues et ceux qui me sont chers.*



Remerciements

Ce travail est le fruit d'une collaboration entre le laboratoire d'Histologie de la Faculté de Médecine de Sfax (Tunisie) et le laboratoire INSERM U 922, « Remodelage osseux et biomatériaux ». L'HEA (Angers-Cedex, France).

*A Monsieur le Pr **Tarek REBAI***

Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour l'encadrement, la confiance que vous m'avez toujours témoignée, et m'avoir donné l'opportunité de découvrir le monde de la recherche. Votre dynamisme, vos conseils et votre disponibilité durant mon parcours de recherche m'ont été d'une aide précieuse. Merci davantage pour le suivi de ce travail avec toute la patience et l'intérêt sollicité ainsi que pour le soutien moral.

*A Monsieur le Pr **Daniel CHAPPARD***

Je tiens à vous remercier de m'avoir accueilli dans votre laboratoire INSERM U 922 et m'avoir fait visiter votre pays et connaître votre équipe : Pr. M F Baslé, Mme Marie-Francoise, Mr. R. Filmon, Mme H. Libouban, Laurence, Florence, Christine, Romain, Sonia ... Merci également pour toute l'aide apportée à la rédaction des articles.

*A Monsieur le Pr **Abdelfattah EL FEKI***

Soyez assuré de ma reconnaissance d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse. Qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect et ma profonde reconnaissance.

*A Monsieur **Abdelhamid CHAOUCH***

Qu'il me soit permis de vous témoigner ma profonde reconnaissance d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse en tant que rapporteur externe de des universités d'inscription.

*A Monsieur le Pr **Eric AGUADO***

Qui a bien voulu accepter de juger ce travail en tant que rapporteur. Qu'il trouve lui aussi le témoignage de ma sincère reconnaissance et mon profond respect.

*A Monsieur le Pr **Maurice AUDRAN***

Qu'il trouve ici l'expression de ma plus profonde gratitude d'avoir accepté d'être membre de ce jury.

Je n'oublie pas mes collègues du laboratoire d'Histologie de la Faculté de Médecine de Sfax, ainsi que ceux des différents services de CHU d'Angers et du laboratoire INSERM U 922, particulièrement Fatma, Fakhri, Rim, Neila, Nacira, Stéphane, Aline, Hervé, Johanne ... qui m'ont aidé à avancer dans ce travail.

Un petit clin d'œil à mes amis d'Angers : Kathy, Thomas, Jérôme, Madaïna, Dana, Nicolata, « Costa », Marie-Anne, ... pour les bons moments passés que ce soit au CHU d'Angers ou en dehors. J'espère que l'on se reverra bientôt,

*Ce travail n'aurait pas pu être mené à bien sans la participation d'autres personnes.
Le personnel du laboratoire de pharmacologie du FMS,
Le personnel du laboratoire de cytologie du CHU d'Angers,
Le personnel des laboratoires de biochimie du CHU de Sfax, et de CHU d'Angers surtout
Mr Kamel JAMOSSI et Mr Yves GALLOIS,
L'équipe de l'animalerie du CHU d'Angers,
Mme A. Amouri du laboratoire de cytogénétique de l'Institut de Pasteur de Tunis.*

Une thèse est une période avec des bons moments et d'autres qui le sont moins. Ce sont dans ces derniers que l'on reconnaît la véritable amitié. Cher «Taoussi», cher «Bardhoun¹», chère Selma, chère Amira, cher «Dali», cher Mohammed et cher «Jaâ», je vous remercie du fond du coeur. Merci d'être là et bon courage.

Je ne saurais terminer sans remercier tout ces qui ont été à mes côtés, de m'avoir soutenu, aidé et supporté pendant ces dures années. Merci à tous d'être si présent.

Table des matières

TABLE DES MATIERES	1
TABLE DES ILLUSTRATIONS	5
INDEX DES ABREVIATIONS	9
<u>INTRODUCTION</u>	12
I. PHYSIOLOGIE DU REMODELAGE OSSEUX	16
1. ROLE DES FACTEURS DE CROISSANCE	18
2. SYSTEME RANK/RANKL/OPG ET REMANIEMENT OSSEUX	19
2.1. <i>Mécanisme hormonal</i>	22
2.1. <i>Réponse aux sollicitations mécaniques</i>	22
3. MARQUEURS DU REMODELAGE OSSEUX	23
II. PHYSIOPATHOLOGIES DES OSTÉOPATHIES FRAGILISANTES	25
1. OSTÉOPATHOLOGIE LYTIQUE NON TUMORALE : OSTÉOPOROSE	26
2. OSTÉOPATHOLOGIES TUMORALES	27
2.1. <i>Myélome</i>	27
2.1.1. <i>Signes cliniques</i>	27
2.1.2. <i>Physiopathologie : myélome et microenvironnement osseux</i>	28
2.2. <i>Les métastases osseuses</i>	30
2.2.1. <i>Processus métastatique</i>	31
a) <i>Initiation d'une tumeur primitive</i>	31
b) <i>Perte d'ancrage et activité protéolytique des cellules tumorales</i>	32
c) <i>Motilité des cellules tumorales et invasion locale</i>	32
d) <i>Dissémination métastatique</i>	33
2.2.2. <i>Métastases ostéolytiques</i>	34
2.2.3. <i>Métastases ostéocondensantes</i>	36
a) <i>Facteurs stimulants de l'activité ostéoblastique</i>	36
b) <i>Rôle des protéases</i>	37
2.2.4. <i>Modèles animaux de métastases osseuses</i>	39

III. METHODES D'ANALYSES DE LA MICROARCHITECTURE OSSEUSES	40
1. RADIOGRAPHIE	41
2. IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE (IRM)	41
2. HISTOMORPHOMETRIE	41
3. SCINTIGRAPHIE	42
5. TOMOGRAPHIE A EMISSION DE POSITION (TEP)	42
IV. TRAITEMENTS DES LESIONS OSSEUSES BENIGNES ET MALIGNES ...	43
1. INHIBITEURS DE LA RESORPTION OSSEUSE	44
1.1. <i>Traitement hormonal de la ménopause (THM)</i>	44
1.2. <i>Modulateurs sélectifs des récepteurs aux oestrogènes (SERMs)</i>	44
1.3. <i>Les bisphosphonates</i>	46
2. AGENTS DECOUPLANTS : SEL DE STRONTIUM	48
V. RADICAUX LIBRES, STRESS OXYDANT ET PATHOLOGIES	49
1. GENERALITES	50
2. SYSTEMES DE DEFENSE CONTRE LES ROS	51
2.1. <i>Systèmes de défense enzymatiques</i>	51
2.2. <i>Systèmes de défense non enzymatiques</i>	52
3. STRESS OXYDANT ET PATHOLOGIES	54
3.1. <i>Stress oxydant et intoxication au pesticides</i>	54
3.2. <i>Stress oxydant et cancer</i>	54
<u>MATERIEL ET METHODES</u>	55
I. ANIMAUX ET TRAITEMENTS	56
1. ANIMAUX ET EXPERIMENTATIONS	56
1.1. <i>Intoxication par le tetradifon</i>	56
1.2. <i>Effet de la vitamine E sur les cellules Walker 256/B</i>	56
1.3. <i>Etude des métastases osseuses</i>	57
2. OBTENTION D'ASCITES	58
3. SACRIFICE, PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS	58
3.1. <i>Urines</i>	58

3.2. Sang	59
3.3. Foies et reins	59
3.2. Fémurs.....	59
3.3. Moelle osseuse	59
II. TECHNIQUES D’HISTOLOGIE	59
1. MICROSCOPIE OPTIQUES POUR LES PARTIES MOLLES	59
2. MICROSCOPIE OPTIQUES POUR LES PIÈCES OSSEUSES SANS DECALCIFICATION	60
2.1. Fixation et infiltration	60
2.2. Inclusion et démoulage des blocs	60
2.3. Coupe des blocs	60
2.4. Colorations.....	61
2.4.1. Trichrome de Goldner modifié	61
2.4.2. Coloration de TRAcP.....	61
2.4.3. Coloration au Giemsa fast	61
III. METHODE BIOCHIMIQUES	62
1. TECHNIQUE DE CHROMATOGRAPHIE POUR LE DOSAGE DES VITAMINES	62
2. TBARS TISSULAIRE	62
3. DOSAGE DE L’ACTIVITE DE LA CATALASE (CAT)	63
4. DOSAGE DE L’ACTIVITE DE LA SUPEROXYDE DISMUTASE (SOD)	63
5. DOSAGE DE L’ACTIVITE DE LA GLUTATHIONE PEROXYDASE (GPX)	63
6. DOSAGE DES CARBONYLS	63
7. DOSAGE DE LA CREATININE SÉRIQUE	64
8. DOSAGE DES TRIGLYCÉRIDES	64
9. DOSAGE DES PHOSPHATASES ALCALINES	64
10. STATUS ANTIOXYDANT TOTAL (TAS)	65
11. DOSAGE DU CALCIUM ET DU PHOSPHORE	65
IV. CULTURE CELLULAIRE ET TECHNIQUES DE CYTOGÉNÉTIQUE	66
1. LIGNÉES CELLULAIRES ET CONDITIONS DE CULTURE	66
2.1. Les cellules de la moelle osseuse.....	66
2.2. Les cellules Walker 256/B.....	66
2. TEST D’ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES (CAs)	66
3. TEST D’ÉCHANGE DES CHROMATIDES SŒURS (SCES)	67
4. TEST D’APOPTOSE : HOECHST 33342 ASSAY	67
5. TEST DCFH-DA	68

V. EXPLORATION HISTOMORPHOMETRIQUE DES PIÈCES OSSEUSES	70
VI. RADIOGRAPHIE A RAYONS X	70
VII. MICROTOMOGRAPHIE A RAYONS X	71
1. PRINCIPE D'ACQUISITION ET DE RECONSTRUCTION	71
2. APPORT BIOLOGIQUE DE LA METHODE	72
VIII. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE (MEB)	74
IX. TRAITEMENT STATISTIQUE DES RESULTATS	74
<u>RESULTATS</u>	75
<u>ARTICLE 1:</u>	76
<u>ARTICLE 2:</u>	83
<u>ARTICLE 3:</u>	89
<u>ARTICLE 4:</u>	95
<u>ARTICLE 5:</u>	104
<u>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</u>	111
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	115

ANNEXES

Table des illustrations (Figures & Tableaux)

- Figure 1** Microenvironnement osseux et interactions cellulaires et matricielles
- Figure 2** Le « cercle vicieux » au cours du myélome
- Figure 3** Le processus métastatique
- Figure 4** Mécanismes mis en jeu au cours des métastases ostéolytiques : le cercle vicieux
- Figure 5** Les mécanismes mis en jeu au cours des métastases ostéocondensantes
- Figure 6** Structure globale des bisphosphonates
- Figure 7** Origine intra et extra cellulaire des ROS
- Figure 8** Structures chimiques des tocophérols et tocotriénols
- Tableau 1** Marqueurs biochimiques du remodelage osseux
- Tableau 2** Catégories diagnostiques de l'ostéoporose ostéodensitométrique selon la mesure de la densité osseuse (T-score) et la présence de fractures (critères OMS)
- Tableau 3** Pharmacocinétique et pouvoir antirésorptif des différents bisphosphonates : relation structure - capacité inhibitrice
- Tableau 4** Les espèces réactives de l'oxygène

Matériel et méthodes

- Figure 9** Structure chimique du tetradifon
- Figure 10** Photographie de l'inoculation in situ des cellules Walker 256/B
- Figure 11** Photographie du lecteur de microplaque permettant la mesure de l'intensité de fluorescence
- Figure 12** Mécanisme d'oxydation de la DCFH-DA
- Figure 13** Photographie du système Faxitron Model MX-20
- Figure 14** Photographie du microscanner permettant l'analyse microtomographique à rayons X
- Figure 15** Schéma du principe d'acquisition d'un échantillon par microtomographie X en mode cone-beam

Article 1

- Figure 16** Aspect de l'endoste et de l'os trabéculaire vus au MEB

Figure 17 Coupe histologique au niveau d'un fémur droit sans préalable décalcification, colorée au trichrome de Goldner

Figure 18 Taux de phosphatases alcalines (AlkP) sérique chez les différents lots de rates témoins et traitées au tetradifon durant 6 et 12 semaines

Tableau 5 Paramètres histomorphométrique de la spongieuse secondaire des fémurs pour les rates témoins et traitées au tetradifon pendant 6 et 12 semaines

Tableau 6 Teneurs sériques et osseux en calcium et en phosphore chez les rates témoins et traitées au tetradifon pendant 6 et 12 semaines

Article 2

Figure 19 Taux des échanges survenus entre les chromatides sœurs (SCEs) dans la moelle osseuse des rates femelles témoins et traitées au tetradifon durant 6 et 12 semaines à une dose de 2430 mg/kg PC

Figure 20 Taux du TBARS dans le foie, l'ovaire, le rein et le poumon des rates témoins et traitées au tetradifon durant 6 et 12 semaines

Tableau 7 Types et pourcentage d'aberrations chromosomiques (CAs) enregistrés chez les rates témoins et traitées pendant 6 et 12 semaines

Tableau 8 Evolution des paramètres antioxydants envisagés ; vitamines A et E (VA et VE) du rapport VE/TG, et du statut antioxydant total (TAS)

Article 3

Figure 21 Structure chimique de l'alpha tocophérol acétate (ATA)

Figure 22 Photographie des cellules Walker 256/B cultivées *in vitro*

Figure 23 Image des cellules Walker 256 montrant des fragmentations nucléaires : corps apoptotiques

Figure 24 Pourcentages de cellules montrant des corps apoptotiques avec et sans traitement à l'alpha tocophérol acétate

Figure 25 Intensités de fluorescence détectées par DCFH-DA chez des cellules Walker avec et sans traitement à l'alpha tocophérol acétate

Article 4

Figure 26 Radiographie des fémurs droits de rat Sham (A), injecté en intraosseux avec 10^6 cellules Walker 256 (W256), injecté en intraosseux avec 10^6 cellules Walker 256 et traité à l'ATA à raison de 45 mg/kg PC (W256+ATA)

Figure 27 Coupes 2D obtenues par microCT et histologie des fémurs de rat témoin et de rat métastasé 20 j après injection *in situ* de cellules Walker 256

Figure 28 Coupe histologique du fémur distal d'un rat métastasé et traité à l'ATA

Figure 29 Ostéoclastes multinucléés TRAcP+ apposés sur les travées osseux

Figure 30 Modèles 3D obtenus par microCT des fémurs d'un rat témoin, d'un rat W256 et d'un rat W256+ATA

Figure 31 Taux de la peroxydation lipidique (TBARS) dans la moelle osseuse, les fémurs et les sérums des rats Sham, W256 et W256 +ATA

Figure 32 Taux d'oxydation protéique (contenus en carbonyle) dans la moelle osseuse, les fémurs et les sérums des rats Sham, W256 et W256 +ATA

Tableau 9 Paramètres histomorphométriques obtenues par microCT

Tableau 10 Activités enzymatiques antioxydantes de SOD, CAT, GSH-p dans la moelle osseuse, les fémurs et les sérums des rats Sham, W256 et W256 +ATA

Article 5

Figure 33 Modèles 3D d'os cortical et trabéculaire des fémurs d'un rat témoin et d'un rat W256

Figure 34 Teneurs sériques et urinaire en calcium et en phosphore des rats témoins et W256

Figure 35 Coupes histologiques de rein et de foie de rats SD témoin ou après injection intraosseuse de cellules W256

Figure 36 Teneurs sérique et urinaire en créatinine et en protéine des rats témoins et des rats métastasés 20j après injection intraosseuse de cellules Walker 256

Tableau 11 Paramètre biochimiques envisagés chez les rats témoins et W256

Index des abréviations

AlkP	: Phosphatase alcaline
ATA	: Alpha tocophérole acétate
BFR	: Bone formation rate
BMP	: Bone Morphogenetic Protein
β -TCP	: β -Tri-Calcium Phosphate
BV/TV	: Trabecular bone volume
CAs	: Chromosomal aberrations
CAT	: Catalase
CFU	: Colony forming unit
CC	: Carbonyl Content
COX	: Cyclooxygenase
CTX	: C-terminal cross-linked telopeptid of type I collagen
DCF	: Dichlorofluoresceine
DCFH	: 2,7, dichloro dihydrofluoresceine
DCFH-DA	: 2,7, dichloro dihydrofluoresceine diacétate
Dkk	: Dickkopf
DMO	: Densité Minérale Osseuse
DPYD	: deoxypyridinoline
DXA	: Dual X-ray absorptiométrie
EcNOS	: Endothelial nitric oxide synthase
EGF	: Epidermal growth factor
ER	: Estrogen receptor
ESF	: Extrémité supérieure du fémur
ET-1	: Endothéline-1
FGF	: Fibroblast Growth Factor
GFP	: Green Fluorescent Protein
GSH-Px	: Glutathione peroxydase
HA	: Hydroxyapatite
HSP	: Heat Shock Protein
IGF	: Insulin Growth Factor
IL	: Interleukine
MAT-Ly-Lu	: Metastatic Anaplastic Tumor metastasizing to Lymph node and Lungs
M-CSF	: Macrophage-colony stimulating factor

MicroCT	: Microtomographie-X
MMP	: Matrix metallo proteinase
NTX	: N-terminal cross-linked telopeptid of type I collagen
OAF	: Osteoclast activating factor
OPG	: Ostéoprotégérine
PDGF	: Platelet derived growth factor
PGE2	: Prostaglandine 2
PHEMA	: Poly 2-hydroxyéthyl méthacrylate
PMMA	: Polyméthylméthacrylate
PSA	: Prostate specific antigen
PTH	: Parathormone
PTHrP	: Parathormone related peptide
PYD	: pyridinoline
RANK	: Receptor Activator of Nuclear transcription factor- κ B
RANKL	: Ligand for Receptor Activator of Nuclear transcription factor- κ B
ROS	: Reactive oxygen species
SCEs	: Sister chromatid exchanges
SERMs	: Selective estrogen receptor modulators
SMI	: Structure model index
SOD	: Superoxyde dismutase
Tb.N	: Trabecular number
Tb.Pf	: Trabecular pattern factor
Tb.Sp	: Trabecular separation
Tb.Th	: Trabecular thickness
TEP	: Tomographie à émission de positon
TNF	: Tumor necrosis factor
TRAcP	: Tartrate resistant acid phosphatase
uPA	: Urinary plasminogen activator
VEGF	: Vascular endothelial growth factor
W256	: Walker 256

Introduction

Le tissu osseux est un tissu de soutien hautement spécialisé, caractérisé par une matrice extracellulaire calcifiée. Cette caractéristique le rend opaque aux rayons X, ce qui permet l'analyse morphologique des os, *in vivo*, par la radiographie ou la tomodensitométrie (Scanner). Cette matrice extracellulaire calcifiée possède des propriétés permettant au tissu osseux d'assurer de multiples fonctions. Le tissu osseux possède une fonction métabolique puisqu'il constitue les réservoirs de calcium (99%) que l'organisme peut mobiliser par résorption, selon ses besoins. En outre, Il accomplit une fonction mécanique en donnant au corps sa structure, et en supportant le poids de l'organisme et les divers contraintes physiques. Il soutient et protège les parties molles, et renferme la moelle hématopoïétique, qui est le siège de l'hématopoïèse. La moelle est généralement localisée au niveau des épiphyses des os longs et dans les os plats (sternum, os iliaque ...) et des espaces médullaires.

Quelque soit sa nature, toute pièce osseuse a une corticale (os cortical) dense et épaisse faite de tissu haversien. Le reste de la masse osseuse est faite d'os trabéculaire (20%) d'aspect régulier. Il contient des travées osseuses organisées en réseau tridimensionnel connecté, constitué de plaques et de piliers, déterminant des espaces médullaires où se trouve la moelle et des adipocytes (Whitehouse, *et coll.* , 1971, van Ruijven, *et coll.* , 2005).

Les travées sont orientées selon les lignes de contraintes exercées sur l'os, d'une part par la force de gravité et d'autre part par les tensions musculaires (Loi de Wolff) de façon à supporter les contraintes auxquelles l'os est soumis. En effet, à chaque niveau d'organisation osseuse, de l'échelon moléculaire à l'échelon anatomique, tout est fait pour que l'os s'adapte aux contraintes mécaniques. La microarchitecture de l'os trabéculaire est considérée comme un des facteurs test importants de la qualité osseuse. Dès lors, toute désorganisation de la microarchitecture de l'os trabéculaire contribue à rendre l'os moins résistant, aboutissant à et une fragilisation pourvoyeuse de fractures.

L'os contient des cellules, mais également beaucoup de minéraux qui lui confèrent sa solidité. Pour assurer ses fonctions, l'os subit un processus perpétuel de remaniement qui résulte de l'activité d'unités cellulaires, groupes opérationnels dans lesquels collabore un ensemble de cellules osseuses comme les ostéoclastes qui résorbent le tissu ancien, les

ostéoblastes qui apposent de nouvelles unités de structures élémentaires (BSU, pour basic structure unit) mieux adaptées.

Physiologiquement, il existe un équilibre théoriquement parfait entre la synthèse et la résorption. Lors du remodelage osseux physiologique, la destruction ostéoclastique de l'os est étroitement suivie et couplée d'une formation osseuse induite par les ostéoblastes. Ce couplage est équilibré entre les cellules ostéoclastiques et les cellules ostéoblastiques ; il permet de conserver la masse osseuse avec maintien de l'architecture osseuse.

Cependant, il existe avec l'âge un léger déséquilibre entre résorption et formation, cette dernière ne compensant pas totalement la quantité d'os résorbée (Rizzoli, *et coll.*, 2001, Ferretti, *et coll.*, 2003). Il existe en fait, une perte osseuse minime, responsable de ostéopénie physiologique progressive qui intervient à partir de 30 à 40 ans après l'acquisition du capital osseux ('peak bone mass') (Rizzoli, *et coll.*, 1999, Ferretti, *et coll.*, 2003).

Le déroulement du remodelage est contrôlé par les cellules osseuses, par un réseau complexe de facteurs hormonaux et locaux (cytokines et facteurs de croissance) présents au sein du microenvironnement médullaire, par des molécules supports et par des contraintes mécaniques. Le déséquilibre du remodelage physiologique peut, suivant sa sévérité, être responsable de fractures multiples avec ou sans traumatisme majeur.

Les ostéopathies les plus fréquentes dérivent d'une balance négative entre résorption ostéoclastique et formation ostéoblastique ; c'est le cas des ostéoporoses et des ostéolyses tumorales (myélome, métastases osseuses du cancer du sein). D'autres pathologies présentent une balance positive entre résorption et formation : ostéopétroses et ostéocondensations tumorales (métastases du cancer prostatique).

Les os sont le site le plus courant des tumeurs secondaires. Les métastases osseuses constituent une cause la plus commune de décès post cancer chez l'espèce humaine. Les bisphosphonates et les biomatériaux sont, de nos jours, deux avancées thérapeutiques efficaces pour traiter les os métastasés.

Nous nous sommes attachés, dans ce travail de thèse, à étudier le microenvironnement osseux chez le rat conditionné par l'intoxication par une substance de type SERMs (selective estrogen receptor modulator) et par les métastases expérimentales provoquées, ainsi qu'une caractérisation et un essai préclinique de traitement de perte osseuse.

La première partie de ce travail sera consacrée à synthétiser les connaissances actuelles sur la physiologie du remodelage osseux ainsi que la physiopathologie des pertes osseuses bénignes et malignes. Nous détaillerons les principaux marqueurs du remodelage osseux, les bisphosphonates utilisables dans le traitement de ces pathologies et les différentes méthodologies d'évaluation des modifications du tissu osseux. Cette partie aborde également le rôle du stress oxydant et des radicaux libres dans les pathologies. La deuxième partie sera consacrée à la présentation, sous forme d'articles, des résultats obtenus. Nous avons caractérisé certains effets physiopathologiques suite à une intoxication par une substance SERMs (le tétradifon) sur le remodelage osseux ainsi que son effet génotoxique. Nous avons ensuite étudié l'effet de l'alpha tocophérol acétate (ATA) sur des cellules Walker 256/B, adénocarcinome de la glande mammaire, ostéophiles et génératrices de métastases ostéolytiques. Nous avons analysé les modifications du microenvironnement osseux avec hyper-résorption induite par inoculation in situ des cellules Walker 256/B par analyses radiographiques histomorphométriques, microtomographiques, enzymatiques (catalase, superoxyde dismutase ...) et immuno-enzymatiques (TRAcP). Par ailleurs, ce modèle a été utilisé pour étudier l'effet d'un antioxydant : l'ATA ainsi que pour caractérisation de ses fonctions rénale et hépatique. La troisième partie de la thèse exposera les conclusions générales et se terminera par les perspectives de ce travail.

I. Physiologie du remodelage osseux

Que ce soit dans l'os compact ou trabéculaire, le tissu osseux est en constant renouvellement grâce à un phénomène de remodelage qui se manifeste tout au long de la vie. La masse et l'architecture osseuse sont conditionnées par les unités fonctionnelles de remodelage osseux (BMU), c'est à dire les activités étroitement couplées dans le temps et dans l'espace des cellules ostéoblastiques (ostéoformatrices) et des ostéoclastes (ostéorésorbantes).

L'ostéoclaste est une cellule géante (50 à 100 μm de diamètre) plurinucléée (4 à 10 noyaux chez l'homme) qui dérive de la lignée granulo-monocytaire (CFU-GM ; Colony Forming Unit - Granulocyte / Macrophage). Etant mobile, l'ostéoclaste fonctionne d'une manière cyclique, alternant des phases migratoires le long des surfaces osseuses et des phases de résorption active créant des lacunes osseuses ('lacunes de Howship').

A la manière d'une ventouse, l'ostéoclaste adhère à la surface de la matrice calcifiée via l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ qui reconnaît la région RGD (Arginine-Glycine-Aspartate). Cet ancrage cellule-matrice induit une bipolarisation morphologique et fonctionnelle de l'ostéoclaste en faisant intervenir des modifications au niveau du cytosquelette. Il se forme en regard de la matrice osseuse une bordure en brosse plissée ('ruffled border') caractéristique de l'ostéoclaste actif. Cette bordure est le siège d'une libération massive de protéases et de protons H^+ dans le compartiment extracellulaire (chambre de résorption). Parallèlement des enzymes lysosomiales sont sécrétées (cathepsine K, métalloprotéases ...) qui assurent la dissolution de la phase organique de la matrice osseuse (Baron, 1995). La TRAcP reste dans les lysosomes intracellulaires et achève la dégradation du collagène. Le pôle basolatéral opposé, en relation avec le microenvironnement médullaire, s'encharge de la majorité des fonctions régulatrices ainsi que le maintien de l'équilibre électrochimique de l'ostéoclaste par des pompes, des canaux et des échangeurs ioniques.

Les ostéoblastes sont des cellules mononucléées, disposées en couches monocellulaires sur les surfaces osseuses. Les ostéoblastes dérivent d'une cellule souche mésenchymateuse présente dans le tissu réticulaire de la moelle hématopoïétique (cellule stromale, CFU-F, Colony Forming Unit – Fibroblastique). Les ostéoblastes ont un aspect cuboïde, et sont doués d'une activité de synthèse protéique. Ces cellules synthétisent et secrètent l'ensemble des protéines constituant la phase organique de la matrice : collagène de type I (90%), protéoglycane et protéines non collagéniques (ostéocalcine, ostéonectine, ostéopontine, phosphatase alcaline, sialoprotéine osseuse...). Au cours de la

phase de synthèse, les ostéoblastes élaborent différents facteurs de croissance tels que TGF- β , IGF-I, IGF-II, BMP, PDGF et FGF. Ceux-ci seront incorporés, sous la forme inactive, au niveau de la matrice osseuse. Une fois libérés lors du processus de résorption, ces facteurs sont activés et stimulent localement la prolifération des cellules ostéoblastiques (Alsina, *et coll.*, 1996).

La matrice de l'os contient des cellules habitantes ou ostéocytes, emmurées au sein de la matrice osseuse dans de petites logettes (les ostéoplastes). Ils dérivent des ostéoblastes intégrés dans la matrice osseuse extracellulaire (1/40 des ostéoblastes). Les ostéocytes sont reliés les uns aux autres, et communiquent avec la surface osseuse, par un système de prolongements cellulaires cheminant dans des canalicules ménagés au sein de la matrice osseuse. Jouant un rôle de mécanorécepteurs, les ostéocytes exercent une influence importante sur la vitalité des autres cellules osseuses (ostéocytes, ostéoblastes, et cellules bordantes « lining cells » recouvrant toutes les surfaces osseuses. Il est fortement suggéré que ce soit l'apoptose des ostéocytes qui joue un rôle dans recrutement et l'ancrage des ostéoclastes sur les surfaces osseuses ainsi que la mise en place de la résorption (Knothe Tate, *et coll.*, 2004).

1. ROLE DES FACTEURS DE CROISSANCE DANS LE REMANIEMENT OSSEUX

Au cours de la synthèse de la phase organique (collagène), les ostéoblastes synthétisent de nombreux facteurs de croissance sous forme inactive, en particulier TGF β , IGF-I, Bone Morphogenic Protein (BMP) (Figure 1). Ces facteurs sont empaquetés avec le collagène lors de l'ostéoformation. Lorsque les ostéoclastes vont assurer le premier volet du remodelage (résorption de la matrice osseuse) ils vont libérer de nombreuses enzymes protéolytiques (cathepsine K, matrix metalloprotease...) pour hydrolyser les protéines collagéniques de la matrice, libérant ainsi, localement sous formes actives les facteurs de croissance. Ceux ci stimulent, par feed-back positif, la différenciation des cellules stromales, situées dans l'environnement immédiat du foyer de résorption, de façon à générer localement de nouvelles cellules ostéoblastiques actives (Erlebacher, *et coll.*, 1998, Roodman, 1999). Le TGF β agit par feed-back négatif pour inhiber la différenciation des précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes matures.

2. SYSTEME RANK/ RANKL/OPG ET REMANIEMENT OSSEUX

Récemment découvert, le triade RANK/RANKL/OPG a totalement révolutionné la compréhension des mécanismes physiopathologiques des ostéopathies (Udagawa, 2002). RANK Ligand (RANKL) (receptor activator of nuclear factor (NF)- κ B ligand) est une protéine liée à la membrane plasmique de nombreuses cellules. Dans l'os, RANKL est exprimé essentiellement par les cellules mésenchymateuses du stroma médullaire et par les ostéoblastes. Les ostéoblastes matures expriment peu de RANKL mais les cellules du stroma médullaire l'expriment en quantité importante. La principale action de RANKL est de stimuler la différenciation des ostéoclastes, leur maturation et d'en inhiber l'apoptose. Les cellules osseuses remodelent l'os trabéculaire en étant au contact des cellules hématopoïétiques ; elles utilisent pour leur différenciation et leurs activités, des cytokines qui peuvent interférer avec celles utilisées par les cellules médullaires (Jilka, 1998, Roodman, 1999). En effet, la différenciation des ostéoclastes par RANKL ne peut se réaliser qu'en présence de la cytokine M-CSF (Suda, *et coll.*, 1999, Hofbauer, *et coll.*, 2000). Le récepteur RANKL se lie avec une forte affinité à la protéine transmembranaire RANK exprimé à la surface des précurseurs ostéoclastiques. Dans l'os l'expression de RANK est limitée aux ostéoclastes. Dans les autres tissus, RANK est exprimé surtout par les fibroblastes, les cellules dendritiques et les lymphocytes T et B. La formation du complexe RANK-RANKL, favorisée par le M-CSF, est en faveur de l'ostéoclastogénèse (Hofbauer, *et coll.*, 2000, Khosla, 2001). Le contact entre la molécule RANKL présente sur les ostéoblastes et la molécule réceptrice RANK présente sur les préostéoclastes déclenche le programme de différenciation cellulaire en ostéoclastes. Cependant cette voie est contrecarrée par l'ostéoprotégérine (OPG). L'OPG est sécrétée par les cellules stromales et les ostéoblastes sous la forme d'une protéine soluble, elle se trouve circulante, sans être liée à la membrane de la cellule. L'OPG tire son nom du fait qu'elle protège l'os de la résorption en se liant à RANKL et empêche son action (Hofbauer, *et coll.*, 2000, Collin-Osdoby, *et coll.*, 2001, Khosla, 2001). *In vivo*, la surexpression du gène d'OPG aboutit à une ostéopétrose sévère ; la déficience en OPG par contre a comme conséquence une grave ostéoporose et une activité ostéoclastique accrue. *In vitro*, l'OPG inhibe la différenciation, la fusion et la survie des précurseurs ostéoclastiques ; elle inactive les ostéoclastes matures et accélère leur apoptose (Hofbauer, *et coll.*, 2000). Le nombre d'ostéoclastes formés le long des surfaces osseuses ainsi que leur activité dépendent donc du rapport RANKL/OPG. L'OPG et RANKL sont donc les clés du

système agoniste – antagoniste qui régule l'ostéoclastogenèse ainsi que la différenciation, la fusion, l'activation, la survie et l'apoptose des ostéoclastes. Les premiers rôles dans cette régulation semblent être tenus par les cellules mésenchymateuses du stroma médullaire puis par RANKL. En effet, ce dernier exerce un rétrocontrôle négatif sur son expression par les précurseurs ostéoblastiques médullaires (Khosla, 2001). Par ailleurs, la surexpression du RANKL stimule la synthèse d'OPG (Khosla, 2001).

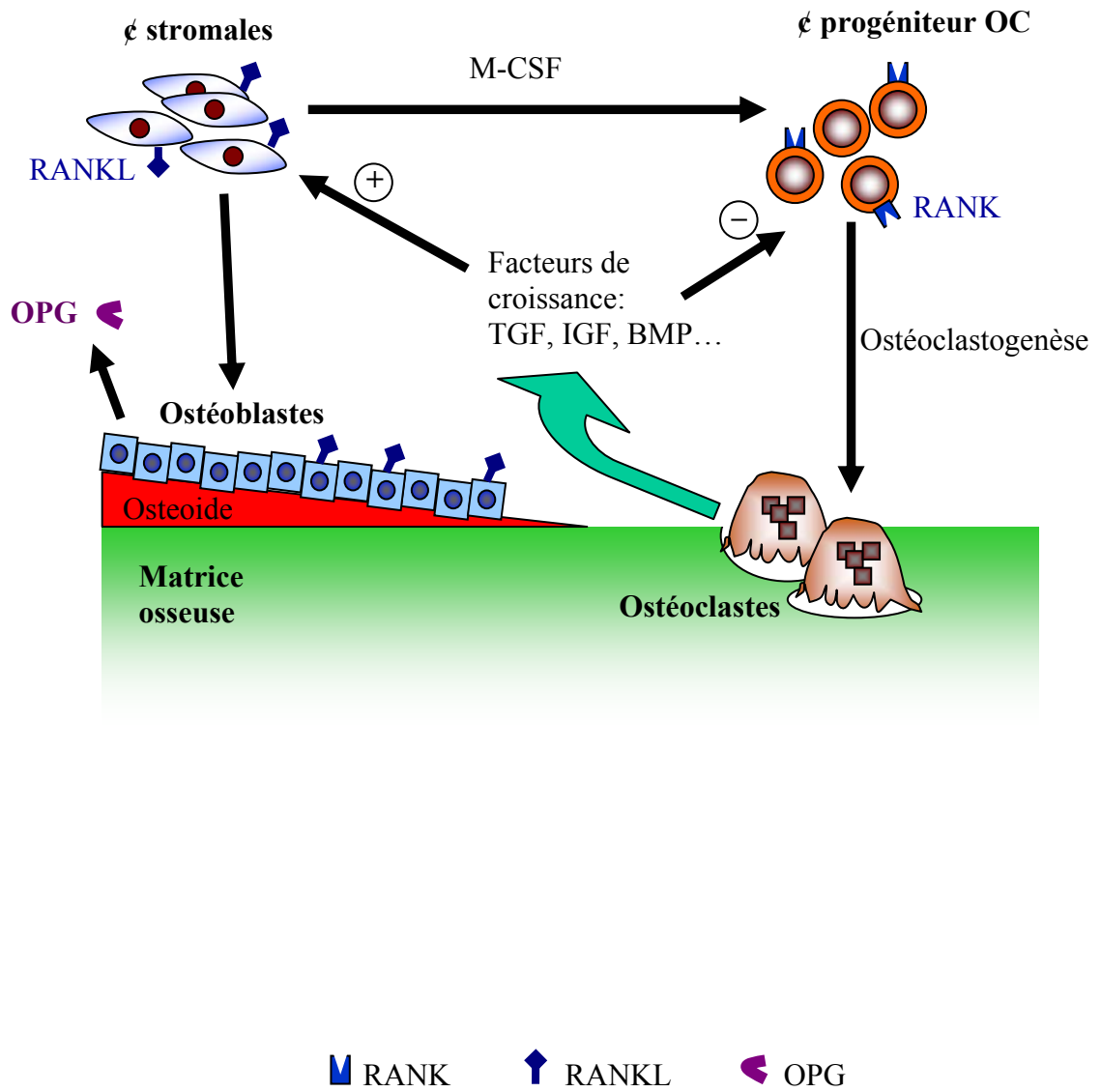


Figure 1 : Microenvironnement osseux et interactions cellulaires et matricielles.

Le remodelage osseux est sous différentes influences : hormonales, micro-environnementales et mécaniques. Toutes les hormones et les facteurs locaux qui agissent sur les ostéoclastes et sur leur activité lytique ont également une action sur le triade RANK/RANKL/OPG qui régule le remaniement osseux.

2.1. Mécanisme hormonal :

C'est le résultat du maintien de l'homéostasie par l'action de la parathormone (PTH) et de la calcitonine, sécrétée par les glandes parathyroïdes et la glande thyroïde respectivement. L'hypocalcémie stimule la sécrétion de la PTH qui stimule à son tour l'activité des ostéoclastes (en se liant à son récepteur sur les cellules précurseurs ostéoblastiques du stroma médullaire), qui libèrent alors du calcium dans le sang en digérant la matrice osseuse et rétablissent la concentration ionique adéquate. La PTH inhibe la sécrétion de l'OPG et active l'expression de RANKL (Fu, *et coll.*, 2002). L'hypercalcémie, stimule la sécrétion de calcitonine qui provoque une inactivation des ostéoclastes en les décollant des surfaces osseuses. La 1,25(OH)₂D, à dose physiologique, inhibe la stimulation de l'expression de RANKL par la PTH et donc augmente la formation osseuse. A dose élevée, supraphysiologique, le métabolite actif de la vitamine D, la 1,25 dihydroxyvitamine D la 1,25(OH)₂D au contraire, augmente l'expression de RANKL en présence de PTH et accélère la résorption osseuse (Suda, *et coll.*, 2003). Les cytokines inflammatoires, IL-1 et TNF α augmentent la destruction osseuse en stimulant la synthèse de M-CSF et de RANKL par les précurseurs ostéoblastiques médullaires, ce qui renforce le nombre et l'activité des ostéoclastes (Khosla, 2001). L'expression de RANKL est stimulée également par IL-6 et les glucocorticoïdes. Le TGF β , les oestrogènes et les BMPs augmentent l'expression de l'OPG (Hofbauer, *et coll.*, 2000). L'expression du récepteur RANK par les ostéoclastes relativement stable, est stimulée par TGF β (Hofbauer, *et coll.*, 2000, Khosla, 2001).

2.2 Réponse aux sollicitations mécaniques :

Il s'agit de l'application de la loi de Wolf qui avait montré que les travées osseuses sont alignées selon les lignes de contrainte et qu'une modification des contraintes entraîne des redistributions des trajets trabéculaires. L'absence totale de sollicitation expliquerait l'acquisition d'une perte osseuse massive (cas des paraplégiques).

3. LES MARQUEURS DU REMODELAGE OSSEUX

Les marqueurs osseux sont traditionnellement classés en marqueurs de la formation ou en marqueurs de la résorption (Tableau 1) car ils représentent plus spécifiquement l'une ou l'autre des deux activités cellulaires osseuses malgré le couplage étroit entre les deux phénomènes. Cependant, l'utilisation de marqueurs biologiques spécifiques du métabolisme osseux pour suivre l'évolution pathologique conduit assez souvent à des résultats divergents. En fait, l'excrétion urinaire de marqueurs non spécifiques, tel que l'hydroxyproline, est fortement augmentée chez les patients métastatiques aussi bien dans le cancer du sein que dans le cancer de la prostate (Francini, *et coll.*, 1990, Stieber, *et coll.*, 1992). Actuellement, l'hydroxyproline n'est plus utilisée car elle n'a plus de valeur.

Les marqueurs les plus intéressants pour la formation osseuse sont l'ostéocalcine, la phosphatase alcaline osseuse et le propeptide N-terminal du procollagène de type I (PINP). Ceux pour la résorption osseuse sont généralement les produits de dégradation du collagène de type I comme la désoxypyridinoline et les télopeptides associés (CTX et NTX).

Dans la matrice osseuse, les molécules de collagène de type I (formées par l'association en triple hélice de 2 chaînes alpha 1 et d'une chaîne alpha 2 sont liées entre elles par des molécules de pontage ; pyridinoline (PYD) et désoxypyridinoline (DPD) au niveau des télopeptides amino (N) et carboxy (C) terminaux.

La pyridinoline se différencie de la désoxypyridinoline par la présence d'un groupement hydroxyle (OH). Ces molécules assurent la stabilité des fibres de collagène au sein de la matrice osseuse. Au cours de la résorption ostéoclastique de la matrice osseuse, les molécules de pontage sont libérées dans la circulation surtout sous forme peptidique, c'est à dire associées à des fragments des télopeptides C-terminaux (CTX) ou N-terminaux (NTX). Une partie de ces peptides de la pyridinoline est secondairement dégradée en PYD et DPD libres au niveau du rein (Voorzanger-Rousselot, *et coll.*, 2007). Les dosages immunologiques de la PYD libre, la DPD libre et les peptides CTX et NTX dans les urines ou le sérum sont récemment recommandés pour les patients présentant une pathologie osseuse (Lein, *et coll.*, 2007).

Tableau 1 : Marqueurs biochimiques du remodelage osseux

Formation	Résorption	
	Plasma/sérum	Urine
- Ostéocalcine (Gla-protéine)	- Phosphatase acide	- Pyridinoline (PYD) et
- Phosphatase alcaline totale	résistante au tartrate	déoxypyridinoline (DPD)
et osseuse	(TRAcP)	libres
- Propeptides C et N-	- Pyridinoline (PYD) et	- Téloptides N (NTX) et
terminaux du collagène de	déoxypyridinoline (DPD)	C-terminaux (CTX)
type I (PICP et PINP)	libres	du collagène de type I
	- Téloptides C-terminaux	- Calciurie
	(CTX) du collagène de type I	- Hydroxyprolinurie

II. Physiopathologie des ostéopathies fragilisantes

A l'état pathologique, apparaît un découplage entre les ostéoclastes et les ostéoblastes avec une balance nettement négative entre la formation et la destruction osseuse : soit par augmentation éventuellement isolée de la résorption, soit augmentation prédominante de la résorption ce qui est à l'origine des ostéopathologies lytiques tumorales et non tumorales.

1. OSTÉOPATHOLOGIE LYTIQUE NON TUMORALE : OSTÉOPOROSE

L'ostéoporose est un problème de santé publique important en constante augmentation. Il s'agit d'une pathologie chronique et systémique du squelette, caractérisée par une diminution de la résistance osseuse (diminution de la masse osseuse) et une détérioration microarchitecturale du tissu osseux entraînant un risque accru de fracture (Sambrook, *et coll.*, 2006). L'impact des fractures ostéoporotiques sur la population âgée est important, en raison principalement des taux élevés d'hospitalisation et de la mortalité accrue (Hasserius, *et coll.*, 2005, Maravic, *et coll.*, 2005). L'incidence de fracture de hanche a augmenté régulièrement tout au long du XX^e siècle, mais de récentes études épidémiologiques ont suggéré que les taux d'incidence sont stabilisés, voire même sont en déclin (Fielden, *et coll.*, 2001, Boufous, *et coll.*, 2004). Cependant, on continuait au dernier congrès ECEO à parler d'une augmentation.

Le risque de fracture est inversement proportionnel à la densité minérale osseuse (DMO). Ce constat est à la base de la classification élaborée, en 1994, par un groupe d'experts réunis par l'Organisation mondiale de la santé (OMS), qui a proposée une définition opérationnelle de l'ostéoporose reposant sur le T-score. Les catégories diagnostiques sont portées par le tableau 2. Les sujets dont la densité osseuse est située à plus de 2,5 écart-types de la valeur de l'adulte jeune ($T < -2,5$) ont été appelés ostéoporotiques. On parle d'ostéoporose sévère ou fracturaire lorsque cette situation densitométrique s'accompagne d'une fracture. Les sujet ayant des densité osseuses situées entre 1 et 2,5 écart-types au dessous de la valeur de l'adulte jeune ($-2,5 < T < -1$) ont été appelés ostéopéniques.

Tableau 2 : Catégories diagnostiques de l'ostéoporose ostéodensitométrique selon la mesure de la densité osseuse (T-score) et la présence de fractures (critères OMS).

T-score densitométrique (DMO)	Fractures ostéoporotiques	Conclusion
T-score > -1	Non	Normalité
-2,5 < T-score < -1	Non	Ostéopénie
T-score < -2,5	Non	Ostéoporose
T-score < -2,5	Oui	Ostéoporose sévère

A noter que ce tableau ne tient pas compte des cas où la densité osseuse est intermédiaire ($-2,5 < \text{T-score} < -1$) mais associée souvent à des fractures non traumatiques et que la majorité des auteurs s'accordent à considérer comme ostéoporotiques.

Pendant la croissance, la masse osseuse augmente rapidement et continue d'augmenter pendant quelques années jusqu'à atteindre un pic. Les sujets qui ont un capital osseux faible seront plus exposés à l'ostéoporose que les autres. Le pic de masse osseuse est en partie déterminé par la génétique, mais il est très influencé par la nutrition et l'activité physique. Dès lors, de simples modifications d'hygiène de vie (alimentation riche en calcium, en vitamine D et en protéines, le maintien d'une masse corporelle correcte, une exposition solaire suffisante, une activité physique quotidienne privilégiant les sports ...) le permettent de ralentir la perte osseuse, et ce particulièrement chez les femmes, bien avant celle liée à la carence œstrogénique (Berdah, 2007).

2. OSTEOPATHOLOGIES TUMORALES

2.1. Myélome

Le myélome représente 1% des tumeurs malignes. Il s'agit d'une hémopathie maligne liée à la prolifération et l'accumulation d'un clone de plasmocytes tumoraux à l'intérieur de la moelle osseuse. Sa prévalence est de 1/10 000 avec un médiane de survie d'environ trois ans (Angtuaco, *et coll.*, 2004).

2.1.1. Signes cliniques

C'est une pathologie caractérisée cliniquement par des lésions ostéolytiques se présentant sous la forme de foyers localisés au voisinage des plasmocytes tumoraux. En plus de l'hypercalcémie, ces lésions ostéolytiques entraînent des troubles cliniques graves tels que fractures, compression médullaire douleurs osseuses rebelles (Roodman, 1997). Parmi les

complication du myélome on cite l'insuffisance rénale (25% des cas) suite à la précipitation des chaînes légères des immunoglobulines monoclonales, surtout l'immunoglobuline G, dans les tubes collecteurs (Blade, *et coll.*, 2005).

2.1.2. Physiopathologie : myélome et microenvironnement osseux

La destruction osseuse au cours du myélome multiple n'est pas liée aux cellules plasmocytaires tumorales elles-mêmes, mais à une augmentation de l'activité ostéoclastique expliquant l'élévation du nombre des ostéoclastes ainsi que le nombre des surfaces érodées dans le voisinage immédiat des nodules plasmocytaires. En fait, les plasmocytes tumoraux élaborent de nombreux facteurs locaux (OAF - Osteoclast activating factor) qui :

- stimulent l'activité ostéoclastique : IL-1 β , IL-6 et son récepteur soluble IL-6Rs, TNF α , CCL3/MIP-1 α (Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha) (Choi, *et coll.*, 2000, Choi, *et coll.*, 2001, Abe, *et coll.*, 2002).
- inhibent l'activité ostéoblastique : la protéine Dkk1 (Tian, *et coll.*, 2003).
- stimulent (via des molécules d'adhérence telles que VCAM-1/VLA4) la production d'IL-6 et du RANKL par les cellules stromales

L'IL-6 en association avec son récepteur soluble favorise la prolifération et la survie des cellules tumorales (Barillé, *et coll.*, 2000). Il apparaît donc, au cours du myélome, un véritable cercle vicieux au cours duquel les cellules tumorales stimulent les cellules osseuses, les ostéoclastes, qui stimulent en retour la croissance tumorale (Figure 2).

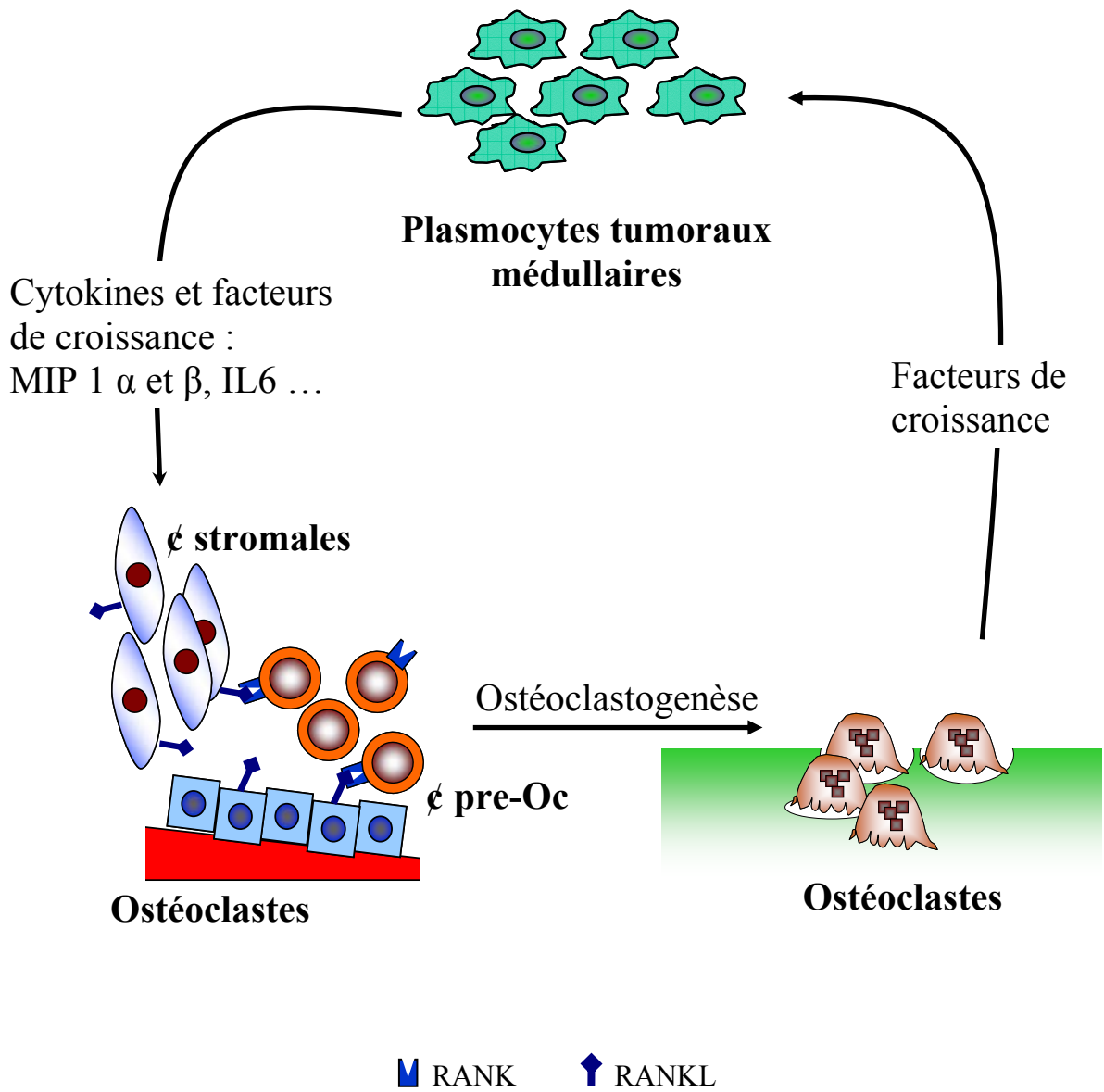


Figure 2 : Le « cercle vicieux » au cours du myélome

2.2. Les métastases osseuses

Les métastases osseuses constituent une complication fréquente dans l'évolution d'une tumeur maligne et l'on estime que plus de la moitié des malades développent une métastase osseuse dans le cours évolutif de leur maladie.

A partir d'une tumeur primitive, des cellules sont capables de se détacher et de passer dans la circulation sanguine ou lymphatique. Lorsque des cellules néoplasiques issues d'une tumeur primitive vont migrer et se localiser à l'intérieur de la moelle, elles vont interférer d'une part, avec le développement des différentes lignées hématopoïétiques issues de nombreuses cellules souches, mais aussi et de façon concomitante avec le remodelage osseux.

La dissémination métastatique est le processus qui amène une ou des cellules tumorales présentes dans une tumeur primitive solide connue ou méconnue à migrer, à s'implanter et à proliférer dans un organe distant pour former des tumeurs secondaires. Le développement d'une métastase est l'aboutissement d'un programme multigénique supplémentaire à celui impliqué dans la tumeur primaire (Kang, *et coll.*, 2003). Les propriétés métastatiques résultent de l'altération de l'expression d'un groupe spécifique de gènes faisant inclure l'hypoxie qui s'installe lors de la progression tumorale (Vaupel, 2004).

Les métastases osseuses correspondent à un stade avancé et sont habituellement incurables : seulement 20% des patients avec un cancer du sein sont encore vivant cinq ans après la découverte de métastases osseuses. Le cancer du sein et de la prostate sont deux types de tumeurs qui métastasent couramment dans l'os. L'installation sélective des cellules tumorales dans l'os est due à :

- la capacité à se détacher du site tumoral primaire grâce à une perte d'expression des molécules d'adhésion cellule-cellule (cadhérine E, intégrines...) et à la surexpression de métalloprotéinases matricielles leur permettant de migrer dans la moelle.
- La capacité à adhérer sélectivement aux endothéliums des capillaires de la moelle osseuse par des molécules d'adhésion ($\alpha v \beta 3$ pour les métastases prostatiques).
- La rencontre de chémoattractant ; la chémokine stromal-cell derived factor1 (SDF-1) et son récepteur CXCR4 jouent un rôle important pour les métastases prostatiques).
- La rencontre de taux élevés de facteurs de croissance (EGF, IGF, TGF, FGF ...) dans le microenvironnement médullaire.

Ces interactions entre la moelle osseuse et les cellules cancéreuses ont été évoquées pour la première fois par Paget qui a décrit la théorie du " seed and soil " (la graine et le sol) (Guise, *et coll.* , 1998).

Les signes radiologiques et d'imagerie caractérisent les métastases osseuses comme étant ostéolytiques ou ostéoblastiques. Cela représente deux extrêmes d'un continuum dans lequel le dérèglement du processus normal de remodelage osseux intervient et altère la masse ainsi que la microarchitecture osseuse. Les cancers du sein sont le plus souvent associés aux métastases ostéolytiques tandis que les métastases ostéocondensantes sont retrouvées le plus souvent dans les cancers de la prostate. Dans ce travail, nous nous focaliserons essentiellement sur les métastases osseuses ostéolytiques du cancer du sein.

2.2.1. Le processus métastatique

Les métastases résultent d'une série de processus complexes de multiples interactions entre la cellule cible et diverses composantes de son microenvironnement (cellules et matrice extracellulaire).

a) Initiation d'une tumeur primitive :

Le développement d'une tumeur primitive résulte d'un modèle multiétape de la cancérogenèse prenant en compte l'accumulation sur une même cellule d'altérations multiples du génome (Beachy, *et coll.* , 2004). Chaque nouvelle altération confère à la cellule cible un avantage sélectif en termes de prolifération ou de survie. Le point clé du développement des tumeurs est l'altération des oncogènes (C-myc, Cycline D1, β -Caténine, Ras, MDM2...), les proto-oncogènes ou suppresseurs de tumeurs (Rb, PTEN, APC , P53...), les gènes de régulation de l'apoptose (Bcl2, Fas-FasL...), les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (ATM, BLM, ...), et ceux participant à l'élaboration des néovaisseaux sanguins (FGFs, FGFR, VEGFs, VEGFR, TGF...) (Vogelstein, *et coll.* , 2004, Robson, *et coll.* , 2006). Il a été prouvé que l'inactivation d'un seul allèle d'au moins une dizaine de gènes suppresseurs ou régulateur suffit pour augmenter le risque de développement de cancers (Fodde, *et coll.* , 2002). Quant à la nature des causes relatives à ces transformations, il est inutile de rappeler que certains cancérogènes ne provoquent pas de mutations géniques, mais produisent des lésions aneuploïdes. En effet, les cellules souches tumorales sont aneuploïdes et présentent des caryotypes différents (Singh, *et coll.* , 2003, Galli, *et coll.* , 2004).

b) Perte de l'ancrage et activité protéolytique des cellules tumorales :

L'ensemble de ces phénomènes ne suffit pas à transformer une cellule saine en une cellule maligne. D'autres altérations génétiques ou épigénétiques sont nécessaires. Les cellules malignes perdent leurs capacités adhésives : adhérence transitoire ou permanente entre elles par le système CAM (Cell adhesion molecules) et avec la matrice extra cellulaire par le système SAM (Substrat adhesion molecules). Le gène Twist, responsable d'une perte d'adhérence médiée par la cadhérine E et d'une motilité cellulaire accrue, semble être un acteur majeur du processus métastatique (Yang, *et coll.* , 2004). La présence de néovaisseaux, par phénomène d'angiogenèse, avec des parois plus perméables peut favoriser l'essaimage. En fait, les cellules tumorales sécrètent des protéines capables de digérer la matrice extracellulaire et les vaisseaux (sanguins et lymphatiques) avoisinants. La perte de l'adhérence implique le passage d'embolus néoplasiques qui seront convoyés par le sang ou la lymphe (intravasation ou embolisation).

c) Motilité des cellules tumorales et invasion locale :

Les cellules des tumeurs métastatiques possèdent des caractéristiques qui leur permettent de migrer facilement. Leur motilité est augmentée par la présence de thymosine β 15 et de certaines protéines de stress (Hsp27) (Bao, *et coll.* , 1996). En même temps, les cellules cancéreuses sont soumises à des facteurs chémoattractants qui les font préférentiellement métastaser dans l'os. En effet, le microenvironnement osseux relargue un grand nombre de molécules présentant un pouvoir chémoattractant sur les cellules cancéreuses. Les chémokines CXCL12 (SDF-1) et CCL21 ont un pic d'expression dans les organes à destination préférentielle du cancer du sein. Or les cellules du cancer du sein ont une forte expression des récepteurs de ces chémokines CXCR4 et CCR7 (Muller, *et coll.* , 2001, Strieter, 2001). Cette expression est renforcée lors de l'activation du gène HIF-1 α puisque l'inhibition de HIF-1 α entraîne une réduction de l'invasion, de l'adhérence et de la migration cellulaire en réponse à CXCL12 (Liu, *et coll.* , 2006). Il existe d'autres molécules qui ont un pouvoir chémoattractant potentiel. Ainsi les cellules du cancer de la prostate sont attirées par les fragments de collagènes I libérés par la résorption osseuse, l'EGF, le TGF β , l'IGF-I, l'IGF-II et l'ostéonectine (Cooper, *et coll.* , 2000, Keller, *et coll.* , 2001).

d) Dissémination métastatique :

L'intravasation implique le passage d'embolus néoplasiques dans les structures vasculaires où ils seront convoyés par le sang, associées aux molécules de fibrine ou aux plaquettes via les intégrines α IIb- β IIIa, ou la lymphe où ils doivent survivre à l'attaque des cellules NK (Natural killer) du système immunitaire et au stress mécanique du flux sanguin (Paul, 1990). L'activation de récepteur PAR1 (protease-activated receptor 1) par la thrombine permet aux cellules tumorales de se protéger contre le stress mécanique de la circulation (Biggerstaff, *et coll.*, 1999). Dans la circulation, et essentiellement au niveau des capillaires sinusoides de la moelle, l'adhérence des cellules néoplasiques aux cellules endothéliales peut favoriser l'extravasation par des mouvements amiboïdes qui leur permet de gagner la moelle à travers les interstices intercellulaires de ces capillaires (Figure 3). L'extravasation est suivie d'une prolifération des cellules tumorales réalisant une métastase médullaire (Chappard, *et coll.*, 2003).

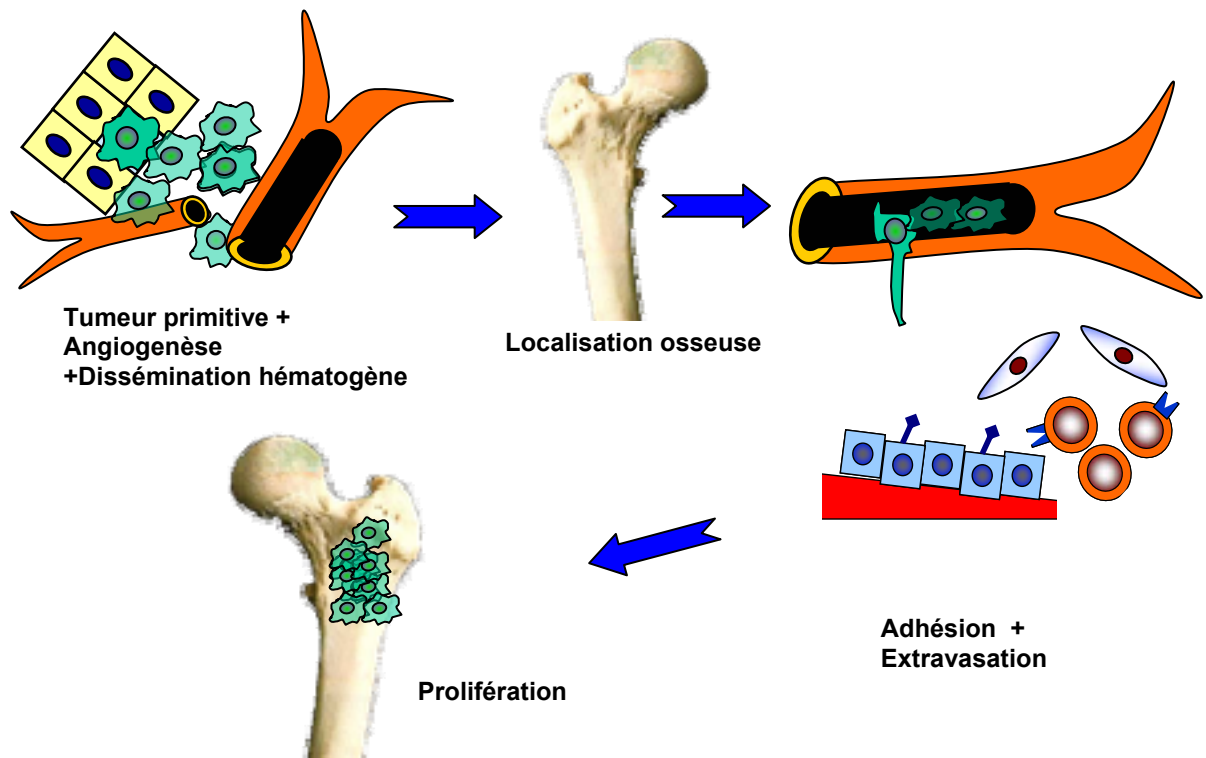


Figure 3 : Le processus métastatique

2.2.2. Les métastases ostéolytiques

Les cellules osseuses sont d'abord responsables de la résorption osseuse induite par les tumeurs, et le remodelage osseux fournit le microenvironnement adapté à la formation de métastases (Roodman, 2004). Ainsi, le chimiotactisme, la croissance et la colonisation de l'os par les cellules du cancer primitif est facilité par une accélération du remodelage.

Les cellules tumorales peuvent libérer plusieurs facteurs comme l'IL-1, IL-6, les TNFs, le TGF- α et des prostaglandines (Boucharaba, *et coll.*, 2004). Ces facteurs vont aboutir à une potentialisation de l'ostéoclastogenèse (de la Mata, *et coll.*, 1995) et prolonger la survie des ostéoclastes par l'élaboration de CSF-1 (Colony Stimulating Factor 1) (Yin, *et coll.*, 2005). En effet, les cellules des tumeurs ostéolytiques élaborent aussi des grandes quantités d'un facteur similaire à la PTH, nommé *PTH related peptide* (PTHrP), distinct de la PTH mais présentant des effets biologiques semblables (Mundy, 2002). Chargés de stimuler l'activité de résorption des ostéoclastes, cette protéine se fixe sur les mêmes récepteurs que la PTH et entraîne des réponses similaires (expression du RANKL, ostéoclastogenèse, hypercalcémie...) (Wada, *et coll.*, 2006). Certaines cellules cancéreuses ont été décrites comme capables de relarguer directement du RANKL soluble (Kozlow, *et coll.*, 2005). La PTHrP dérivée des tumeurs et d'autres stimulateurs de la résorption osseuses (tels que le M-CSF) peuvent être détectés dans les métastases osseuses induites chez la souris (van der Pluijm, *et coll.*, 2001).

L'activité ostéoclastique accrue stimulée par la PTHrP, peut mener à une libération locale des facteurs de croissance matriciels comme IGF-1, BMPs, et surtout du TGF- β (Chappard, *et coll.*, 2003). Ceux-ci viennent s'ajouter à ceux élaborés massivement par les cellules métastatiques. Libéré sous sa forme active, le TGF- β s'avère être un puissant promoteur de la prolifération tumorale (Kakonen, *et coll.*, 2002). En retour, les cellules cancéreuses produisent plus de PTHrP. On décrit alors la formation d'un véritable « cercle vicieux » au niveau duquel les phénomènes de résorption osseuse et développement tumoral s'entretiennent d'une façon mutuelle (Figure 4).

Les ostéoblastes produisent le polypeptide PDGF ('platelet derived growth factor') qui augmente la prolifération tumorale, la résorption osseuse, la production de collagénase et la dégradation du collagène (Roodman, 2003). Les fragments peptidiques de collagène,

ainsi libérés, ont également un pouvoir chimiotactique sur les cellules cancéreuses. Ces fragments, ainsi que les phosphates libérés à partir de l'hydroxyapatite, pourraient alors être impliqués dans le recrutement des nouvelles cellules métastatiques au niveau du microenvironnement métastatique (Yoneda, *et coll.*, 2005).

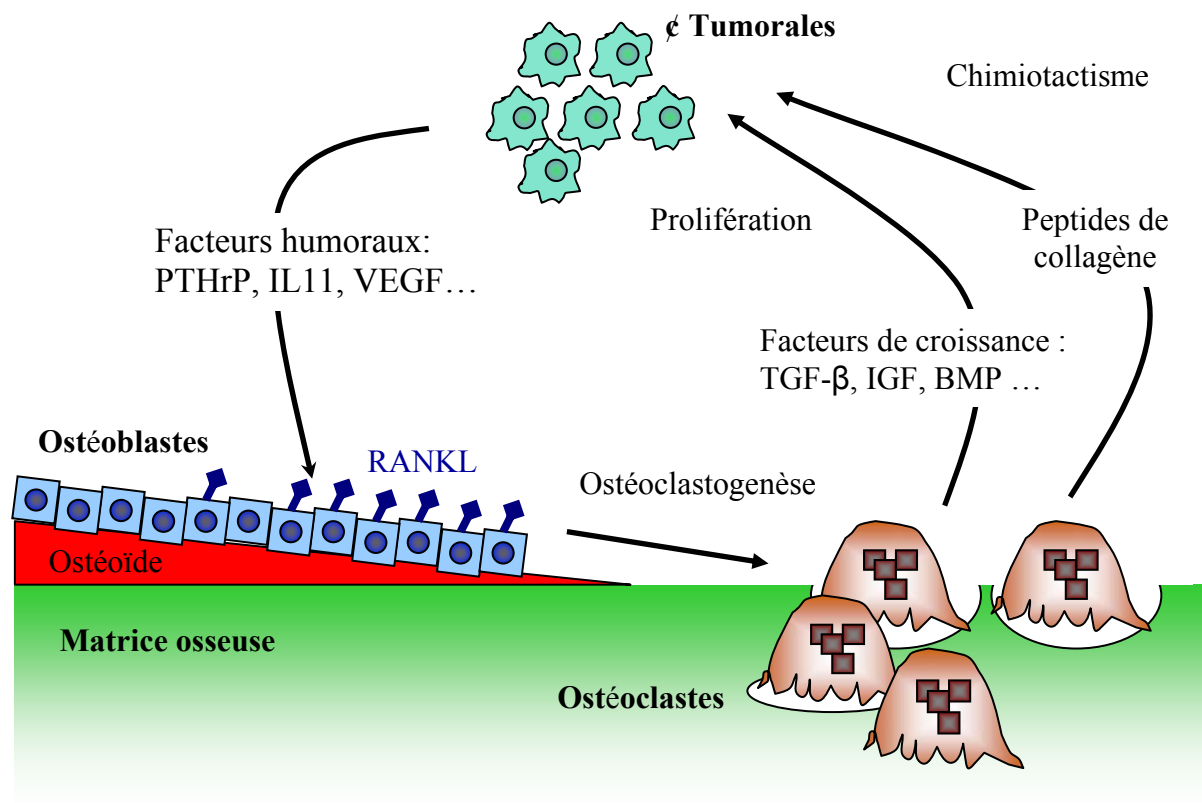


Figure 4: Mécanismes mis en jeu au cours des métastases ostéolytiques : le cercle vicieux

2.2.3. Les métastases ostéocondensantes

L'attachement des cellules cancéreuses prostatiques à l'os se fait par l'intermédiaire de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ (Kostenuik, *et coll.*, 1996, Tantivejkul, *et coll.*, 2004).

Bien que les lésions osseuses d'origine prostatique sont ostéoblastiques, elles sont associées à des lésions ostéolytiques et leur signification pronostique dépend généralement de leur extension. Les cellules d'adénocarcinome prostatique, comme toute cellule tumorale, élaborent différents facteurs (PTHrP, IL1, IL-6, et M-CSF) qui stimulent l'ostéoclastogénèse. Néanmoins, ce type de cellules néoplasiques a la particularité de libérer directement dans le microenvironnement des cytokines stimulant la prolifération et la survie ostéoblastique. Parallèlement à cela, elles libèrent des protéases qui bloquent l'activité de la PTHrP (Bonfil, *et coll.*, 2007)(Figure 5).

2.2.3.1. Facteurs stimulants de l'activité ostéoblastique

Les adénocarcinomes prostatiques sécrètent plutôt des endothélines qui stimulent la prolifération des ostéoblastes et donc une formation excessive d'os. Le taux circulant d'endothéline 1 (ET-1) et l'expression du récepteur de type A (ET_A) sont augmentés chez les patients atteints de cancer prostatique métastatiques. Le traitement par un antagoniste du récepteur 1A de l'endothéline diminue la formation ostéoblastique et la prolifération tumorale chez l'animal (Guise, *et coll.*, 2003). Les carcinomes prostatiques (PC-3) expriment des fortes quantités en TGF- $\beta 2$ qui stimule la prolifération des ostéoblastes *in vitro* aussi bien que la formation osseuse *in vivo* (Mundy, 2002).

Les cellules du cancer de la prostate expriment : l'IGF-2 (Koeneman, *et coll.*, 1999), les FGFs acide (FGF-1) et basique (FGF-2), et le PDGF qui stimulent la formation osseuse *in vivo* (Mundy, 2002). Les cellules cancéreuses MCF-7-Neu injectées chez la souris induisent des niveaux de PDGF-BB sérique plus importants que les cellules MCF-7 parentales et sont également responsables de métastases plus agressives que les MCF-7 parentales (Yi, *et coll.*, 2002).

Les interactions des facteurs de croissance avec leurs récepteurs sont potentialisées par l'ET-1 qui est un médiateur central des métastases ostéoblastiques. L'ET-1 est impliquée dans la formation osseuse puisque des souris $ET-1^{-/-}$ présentent une hypoplasie des os de la face (Guise, *et coll.*, 2003). Elle a été impliquée dans les métastases ostéoblastiques du cancer de la prostate chez l'homme et chez la souris (Mundy, 2002, Guise, *et coll.*, 2003).

Une élévation de l'expression de BMPs est notée chez les patients présentant un cancer de prostate. Les BMP 2, 4 et 6 sont exprimées par les cellules de cancer prostatique (Lee, *et coll.*, 2003). En plus de leurs effets paracrines sur les ostéoblastes, les BMPs favorisent la survie des cellules cancéreuses (Yin, *et coll.*, 2005). Il a été montré que le carcinome prostatique métastatique exprime du gène Wnt1 (Chen, *et coll.*, 2004). Dans les premiers temps de la métastase médullaire, les cellules cancéreuses expriment Dkk1 qui, en s'associant au récepteur LRP5/6, bloque l'activité ostéoblastique en favorisant le phénotype ostéolytique. A un stade plus avancé, les facteurs de croissance relargués de la matrice dominant l'expression de Dkk1 et l'action ostéoblastique de Wnt sera stimulée (Hall, *et coll.*, 2006). Une activation de la voie Wnt a été mise en évidence dans les ostéoblastes de patients avec métastases osseuses ostéocondensantes (Logothetis, *et coll.*, 2005). L'ensemble de ces facteurs aboutit à une augmentation locale du nombre d'ostéoblastes actifs et donc à une stimulation de l'apposition ostéoblastique dans le microenvironnement osseux immédiat au foyer métastatique.

2.2.3.2. Rôle des protéases

Les cellules cancéreuses prostatiques synthétisent des protéases comme le PSA (prostate-specific antigen) et l'urokinase uPA (urinary plasminogen activator). Cette dernière (l'uPA) augmente le nombre de métastases osseuses (Achbarou, *et coll.*, 1994). Alors que la PSA, enzyme codée par le gène hKLLK3 qui appartient à la famille multigénique des kallicréines tissulaires humaines (Harvey, *et coll.*, 2000, Pampalakis, *et coll.*, 2007), peut cliver, en N-terminal, et inactiver le médiateur de l'activité ostéoclastique : PTHrP (Cramer, *et coll.*, 1996). L'urokinase uPA et le PSA peuvent activer et potentialiser des protéines ostéogéniques issues de la matrice osseuse sous forme latente (TGF- β ou l'IGF-1 et 2). La libération d'IGF actifs augmente l'activité mitotique des ostéoblastes (Killian, *et coll.*, 1993). La protéine transporteuse du TGF- β comporte des sites de clivage sensibles à l'activité de la plasmine. En activant la plasmine, l'uPA et le PSA provoquent donc indirectement la libération de TGF- β stimulant d'une façon dramatique la formation osseuse (Roodman, 2004).

2.2.4. Modèles animaux de métastases osseuses

Plusieurs modèles animaux de métastases osseuses existent. La majorité des études animales a concerné le modèle murin (Blouin, *et coll.* , 2005, Mao-Ying, *et coll.* , 2006).

L'utilisation des modèles animaux a largement contribué à la meilleure compréhension de la physiopathologie des métastases, en particulier leur retentissement sur la matrice osseuse. De plus, la disposition des outils animaux validés permet le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses.

L'injection de lignées cellulaires cancéreuse (MDA-MB-231,...) chez des souris immuno-déficientes (*nu/ nu*) est un modèle largement répandu de métastases de l'os et de la moelle osseuse. Cependant, la détection par radiographie de métastases osseuses, ostéolytique ou ostéocondensantes, n'en fait pas un modèle idéal (Wetterwald, *et coll.* , 2002). La mise en évidence de ces lésions constitue en effet un événement tardif qui ne permet pas d'élucider les processus initiaux tels que le « switch » angiogénique (Hanahan, *et coll.* , 1996). De plus, la radiographie seule ne permet pas de distinguer l'ampleur de la tumeur.

Récemment, des modèles animaux de lésion métastatique, ont été développés. Ceux-ci vont permettre l'étude des mécanismes physiopathologiques des métastases osseuses ostéoblastiques et ostéolytiques (Blouin, *et coll.* , 2006, Mao-Ying, *et coll.*, 2006, Badraoui, *et coll.* , 2007)

III. Techniques d'analyse de la microarchitecture osseuse

1. RADIOGRAPHIE

La radiographie est une projection de la structure du réseau osseux tridimensionnelle en une texture plane, observable sur des clichés en noir et blanc. Les images de radiographies permettent de détecter et de différencier les altérations osseuses induites par métastases : ostéolytiques et/ou ostéocondensantes.

Les images de radiographies peuvent être numérisées et faire éventuellement l'objet d'analyse qui pourraient fournir des informations intéressantes sur l'architecture de l'os trabéculaire (Wilding, *et coll.*, 1995, Buckland-Wright, *et coll.*, 1996, Caldwell, *et coll.*, 1998, Link, *et coll.*, 1999, Chappard, *et coll.*, 2001). En ostéologie, les résultats obtenus par l'analyse de texture au niveau 2D et 3D sont le reflet de celles obtenus par histologie ou par microtomographie X (Chappard, *et coll.*, 2005, Guggenbuhl, *et coll.*, 2006).

2. IMAGERIE PAR RESONNANCE MAGNETIQUE (IRM)

L'IRM est actuellement considérée comme le *gold standard* pour le diagnostic des pathologies osseuses (Wallace, 2002, McGinley, *et coll.*, 2006). Ses principales qualités sont sa reproductibilité et essentiellement sa résolution spatiale (McGinley, *et coll.*, 2004).

3. HISTOMORPHOMETRIE

L'histomorphométrie est la méthode de choix pour la compréhension de la physiologie et la physiopathologie du remodelage osseux. Le prélèvement, par biopsie osseuse pratiquée au niveau de l'os iliaque chez l'homme, est étudié sans préalable décalcification après inclusion dans une résine méthacrylique. C'est une méthode quantitative, applicable également chez le rat, est la seule qui permet d'évaluer à la fois l'activité cellulaire et tissulaire *in vivo*. L'analyse inclue des paramètres statiques, dynamiques, et architecturaux.

4. SCINTIGRAPHIE

Le radio-isotope le plus utilisé de nos jours, pour l'exploration scintigraphique du squelette est le technétium 99m (99mTc). Ce traceur se fixe préférentiellement dans les territoires bien perfusés et où existe une ostéogenèse active (Goltzman, 2001). Il s'agit d'une injection d'un mésomère (tel que 99mTc) qui se désintègre puis la radioactivité résultante issue du corps est enregistré. Après injection, la répartition du traceur est détectée sous forme d'images par une caméra. Normalement cette répartition doit être relativement homogène. Cependant, elle peut être renforcée au niveau des tissus mous selon le degré d'élimination de l'isotope ou des tissus calcifiés soumis aux contraintes physiques importantes ou bien le siège d'un remodelage accru. L'apparition de nouveaux radioéléments et d'appareil d'acquisition sophistiquées permettra de développer l'aspect thérapeutique par meilleure quantification et suivi des lésions osseuses. Des travaux sont en cours au sein du laboratoire pour utiliser la scintigraphie osseuse dans le cadre de la détection de métastases osseuses chez le rat.

5. TOMOGRAPHIE A EMISSION DE POSITON (TEP)

La TEP est une imagerie scintigraphique qui utilise un traceur radioactif émetteur de positons. Cette technique l'identifie les endroits de l'organisme présentant des cellules cancéreuses en se basant sur la consommation anormalement élevée de glucose par ces derniers (20 à 30 fois plus de glucose que les cellules normales). Cette hyperactivité est due à la fois à une augmentation de la captation du glucose (par activation des transporteurs membranaires GLUT 1) et aux modifications enzymatiques responsables d'une augmentation de la glycolyse, avec production de lactates au détriment de la voie oxydative (Couturier, *et coll.*, 2004). Les isotopes radioactifs utilisés, dits « propres », s'incorporent facilement à des molécules. L'altération des propriétés biologiques est quasi nulle. Le traceur le plus couramment utilisé est le fluoro-déoxyglucose (18-FDG) dont la durée de vie du fluor 18 est de 110 minutes. La captation du 18-FDG a été corrélée avec l'importance des contraintes mécaniques, l'augmentation de la vascularisation et la formation de woven bone induite (Li, *et coll.*, 2005, Silva, *et coll.*, 2006).

IV. Traitements des lésions osseuses bénignes et malignes

Le diagnostic des lésions osseuses repose sur un faisceau d'arguments cliniques, radiologiques, scintigraphiques et biologiques et dont la certitude n'est souvent acquise que par un examen histologique ou cytopathologique.

Quoique le tissu osseux possède la capacité de se régénérer, le processus de réparation osseuse est tributaire de nombreuses situations cliniques et pathologiques. L'arsenal thérapeutique actuel des patients ayant des lésions osseuses repose sur l'utilisation de la radiothérapie, d'inhibiteurs de la résorption osseuse, d'agents découplants, et de biomatériaux de comblements. Les agents anti-ostéoclastiques ; hormones de substitution, modulateurs sélectifs des récepteurs aux oestrogènes (SERMs), et bisphosphonates, permettent de ralentir la progression de la destruction osseuse mais restent malheureusement inefficaces quant à l'évolution ultime des métastases. A l'heure actuelle, seulement les sels de strontium, dites agents découplants, stimulaient la formation osseuse et inhibaient la résorption.

1. INHIBITEURS DE RESORPTION OSSEUSE

1.1. Traitement hormonal de la ménopause (THM, anciennement THS pour traitement hormonal substitutif)

On englobe sous le terme de traitement hormonal substitutif (THS) différents schémas thérapeutiques, associant oestrogènes, progestatifs et androgènes et destinés à compenser les effets de la carence oestrogénique chez les femmes ménopausées ou pour contrecarrer une déficience en hormones sexuelles chez les hommes (Jamin, *et coll.*, 2006, Ribot, *et coll.*, 2007) surtout en cas de castration chirurgicale ou médicale par les agonistes LhRh. Le THS peut être appliqué accompagné ou non à des progestatifs. Il ralentit le remodelage osseux en inhibant le recrutement et l'activité des ostéoclastes (Marcus, *et coll.*, 2002, Novack, 2007). Une étude récente chez la rate a montré que l'oestrogène, via le récepteur α était capable d'induire directement l'apoptose des cellules ostéoclastiques (Nakamura, *et coll.*, 2007).

1.2. Modulateurs sélectifs des récepteurs aux oestrogènes ou androgènes (SERMs et SARMs)

Les SERMs et les SARMs incluent toute molécule capable de se lier aux récepteurs des oestrogènes ou des androgènes respectivement. Donc, ils agissent comme agonistes ou

antagonistes des œstrogènes sur différents tissus (intra et extra-osseux) et ont un effet antirésorptif en diminuant l'activité ostéoclastique par leur effet « estrogen like » (Bryant, *et coll.*, 1999, Gougelet, *et coll.*, 2007).

Il a été montré que les SERMs induisent une stimulation du TGF- β (Yang, *et coll.*, 1996, Narayana Murthy, *et coll.*, 2006) et diminuent les taux sériques en IL-6 (Bryant, *et coll.*, 1999). In vitro, les SERMs, dont le raloxifène, inhibent la différenciation des ostéoclastes via l'IL-6 (Kung Sutherland, *et coll.*, 2003). Les SERMs se présentent comme une alternative à l'oestrogénothérapie substitutive dans la prévention des complications dans la ménopause. En effet, comme les estrogènes, les SERMs réduisent l'hyperactivité ostéoclastique observée après la ménopause. Les deux types de récepteurs sont présents dans les cellules osseuses. Toutefois, la concentration des récepteurs β est haute dans les territoires spongieux alors que la concentration des récepteurs α est supérieure en territoire cortical (Riggs, *et coll.*, 2002). Ainsi, en normalisant l'hyperremodelage osseux postménopausique, les SERMs préviennent la survenue d'une détérioration architecturale plus grande en territoire spongieux ce qui réduit le risque fracturaire trabéculaire mais reste insuffisant pour réduire le risque fracturaire cortical qui impose un effet antiostéoclastique plus puissant. Plus récemment, un polymorphisme génétique du récepteur α aux estrogènes a été montré ce qui pourrait expliquer en plus la mauvaise réponse antifracturaire observée chez certains sujets ostéoporotiques hétérozygotes (Heilberg, *et coll.*, 2005).

La dénomination de « SERMs » peut être étendue à d'autres substances, et on sait actuellement qu'en dehors de l'estradiol, de nombreuses molécules retrouvés dans l'environnement, qu'ils soient naturels (phyto-estrogènes,) ou de synthèse (tibolone, ipriflavones, dérivés organochlorés, pesticides). Ces substances « SERMs-like » sont capables de se fixer avec une affinité plus ou moins importante sur le récepteur des estrogènes et d'induire, selon leur structure et le tissu, une réponse de type agoniste ou antagoniste de celle de l'estradiol (Ribot, *et coll.*, 2000). Le tetradifon est un pesticide organochloré, couramment employé en agriculture pour lutter contre une large gamme d'acariens, présentant une structure semblable à celle de l'œstrogène (*estrogen-like*). Une étude récente chez le rat a montré que, quoi que toxiques, certaines substances organochlorées (le tetradifon) ayant une structure semblable à celle de l'œstrogène (Badraoui, *et coll.*, 2007), peuvent être capables de ralentir le remodelage osseux (Badraoui, *et coll.*, 2007).

En ce qui concerne les pesticides organochlorés a structure *estrogen-like*, il a été montré qu'ils sont capables non seulement d'agir comme des agonistes du récepteur de l'estradiol, mais aussi d'orienter le métabolisme du 17 β -estradiol vers la formation préférentielle de 16 α OH-estrone à propriétés oestrogéniques marquées (Bradlow, *et coll.* , 1995). Il semble démontré que différents pesticides, dont le tetradifon, seraient capables d'inhiber spécifiquement l'aromatase, enzyme fixant l'équilibre entre les androgènes et les oestrogènes, donc d'augmenter le taux d'androgènes, alors que simultanément certains pesticides pourraient en outre agir directement en raison de leur effet oestrogénique (Richard, *et coll.* , 2005). Ces effets ont pour conséquence d'augmenter l'exposition du tissu mammaire aux influences estrogéniques ou *estrogen-like*. Par conséquent, la susceptibilité d'accroître le risque de développement d'un cancer du sein est certaine (Charlier, *et coll.* , 2002). De la même façon l'influence de ces produits sur la fertilité masculine a été envisagée et est possible, que ce soit par puberté précoce (Baron, *et coll.* , 2000, Krstevska-Konstantinova, *et coll.* , 2001) ou hypofertilité (Straube, *et coll.* , 1999, Thonneau, *et coll.* , 1999).

1.3. Les bisphosphonates

Les bisphosphonates sont constitués par une structure de base phosphate-carbone-phosphate (P-C-P), et sur laquelle sont substituées au niveau de l'atome de carbone deux chaînes latérales R1 et R2. Leur efficacité est attribuable au fait qu'ils ont des propriétés anti-résorptives par réduction du remodelage osseux liée à une inhibition de l'activité des ostéoclastes (Rogers, *et coll.* , 2000, Rogers, 2003, Stresing, *et coll.* , 2007). Cette activité inhibitrice, conditionnée grandement par la chaîne R2 : amino ou non amino-bisphosphonates (Rogers, *et coll.*, 2000, Halasy-Nagy, *et coll.* , 2001, Hashimoto, *et coll.* , 2007).

Compte tenu de la distribution élective des bisphosphonates au niveau de l'os, ceux-ci exerceront préférentiellement une action sur les ostéoblastes, ostéoclastes ainsi que leurs précurseurs (Body, *et coll.* , 2002). Les bisphosphonates ont également une activité cytotoxique sur les cellules tumorales en inhibant leur adhérence et leur invasion (Boissier, *et coll.* , 1997, Kunzmann, *et coll.* , 2000, Stresing, *et coll.*, 2007) (Daubine, *et coll.* , 2007). L'inhibition de la néoangiogenèse par les bisphosphonates s'exerce par l'intermédiaire d'une modulation de l'apoptose cellulaire et de l'expression des molécules d'adhésion (Green, *et coll.* , 2002). Des études récentes ont montré que les

bisphosphonates sont des puissants inhibiteurs de l'angiogenèse in vitro et in vivo (Stresing, *et coll.*, 2007) (Hamma-Kourbali, *et coll.*, 2003, Hashimoto, *et coll.*, 2007).

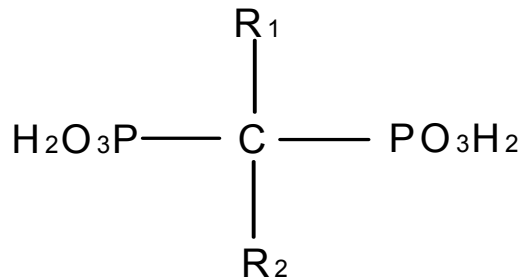


Figure 6 : Structure globale des bisphosphonates

Tableau 3 : Pharmaco-cinétique et pouvoir antirésorptif des différents bisphosphonates : comparaison entre structure et capacité inhibitrice. Données théoriques, d'après (Paycha, *et coll.*, 2007).

Bisphosphonates	Pourcentage de liaison aux protéines plasmique (%)	Pourcentage de fixation sur l'os dans les 24 h (%)	Demi-vie sanguine (h)	Demi-vie osseuse	Puissance thérapeutique
Médronate ^a	?	30	1	Très longue, de quelques semaines à quelques mois	Non applicable
Oxidronate ^a	?	36	1		Non applicable
Ethidronate ^a	?	20	1-6		1
Clodronate	<10	20	2		10
Tiludronate	91	50	2		10
Pamidronate	54	60	0.5		100
Alendronate	78	50	2		500
Risédrionate	24	50	2		5000
Ibandronate	99	40	14		5000
Zolédronate	56	60	2	10000	

^a Bisphosphonate diagnostique

2. AGENTS DECOUPLANTS

Un agent découplant, à double action, stimulerait la formation osseuse et inhiberait la résorption. Ce sont les sels de strontium et le ranélate de strontium a été proposé en thérapeutique. Ce sel est indiqué en prévention primaire et secondaire des fractures vertébrales et de la hanche. Plusieurs études récentes ont montré que le ranélate de strontium renforcerait la microarchitecture osseuse (Jiang, *et coll.* , 2006).

La répartition des sels de strontium dans l'organisme après administration orale, et ses modes d'action cellulaires sont désormais mieux connus qu'auparavant (Dahl, *et coll.* , 2001). Il a été montré que une fois ajouté à une alimentation normale, le strontium diminuait la résorption osseuse et augmentait la formation osseuse et le volume trabéculaire osseux sans trouble de minéralisation (Grynpas, *et coll.* , 1996). Le traitement prolongé au strontium augmente la résistance mécanique des os (Buehler, *et coll.* , 2001).

V. Radicaux libres, stress oxydant et pathologies

1. GENERALITES

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules qui ont perdus un ou plusieurs électrons de l'orbite externe. Cela lui confère une grande réactivité donc une demi-vie très courte. En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable : il va donc se réduire en oxydant un autre composé (système redox) (Halliwell, 1996). Les principales espèces réactives de l'oxygène (ROS, pour reactive oxygen species) figurent dans le tableau suivant :

Tableau 4 : Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

	Nom	Symbole chimique
Formes radicalaires	Anion superoxyde	$O_2^{\cdot -}$
	Radical hydroxyle	OH^{\cdot}
	Oxyde nitrique	NO^{\cdot}
	Radicaux peroxydes	RO_2
	Peroxynitrite	$ONOO^{\cdot}$
	Radical nitrosyl	$ONOOH$
Formes non radicalaires	Oxygène singulet	1O_2
	Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2

Le métabolisme cellulaire produit, à l'état physiologique, plusieurs radicaux libres dérivés de l'oxygène (Fattman, *et coll.*, 2003). Il a été montré que certains ROS sont utilisés par l'organisme comme médiateurs régulant des fonctions cellulaires comme la prolifération et l'apoptose, impliquant des modifications des voies de signalisation intracellulaires associées à une modulation de l'expression génique (Haddad, 2002). Cette production est ainsi en permanence physiologique ; elle est déterminée, dirigée, et utile. Cependant, la production de radicaux libres peut devenir excessive ou résulter de phénomènes toxiques exogènes et l'organisme va devoir contrecarrer ces excès par différents moyens de défense antioxydants. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit de la capacité antioxydante ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, on dit que la balance prooxydative/antioxydative est déséquilibrée. La perturbation de l'équilibre endogène entre radicaux libres et antioxydants de courte ou longue durée, nommé stress oxydant (Berger, 2006).

Généralement, la rupture de cet équilibre est due à la promotion d'espèces activées de l'oxygène, ou radicaux libres oxygénés entraînant l'installation d'un état de stress oxydatif.

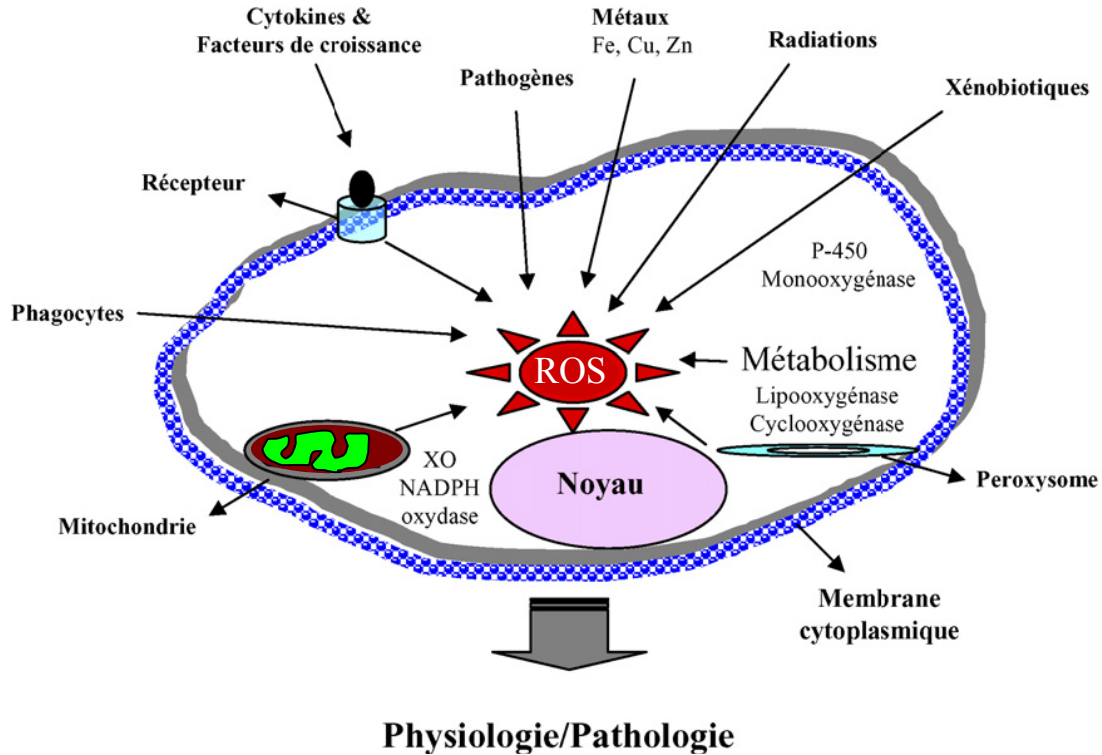


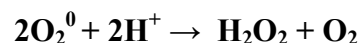
Figure 7 : Origine intra et extracellulaire des ROS
XO : xanthine oxydase ; P-450 : cytochrome P-450

2. SYSTEME DE DEFENSE CONTRE LES ROS

Pour se défendre, l'organisme dispose de moyens de défense contre des radicaux libres. Les uns sont d'origine endogène, comme des enzymes (catalase, glutathion réductase, superoxyde dismutase) ou des facteurs spécifiques (glutathion, acide urique, coenzyme Q10), d'autres sont apportés par l'alimentation (caroténoïdes, vitamines C et E, sélénium...). Tous vont contrebalancer l'action des ROS.

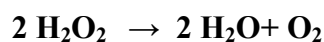
2.1. Systèmes de défense enzymatiques

En présence d'oligo éléments (Cu, Zn, Mn, Fe), les superoxydes dismutases (SOD) sont des antioxydants responsables de la dismutation de l'anion superoxyde selon la réaction suivante :



Les glutathions peroxydes (GPx) sont des enzymes qui détruisent non seulement l'H₂O₂ mais aussi les peroxydes organiques toxiques qui se forment au cours de l'oxydation des acides gras insaturés et du cholestérol.

La catalase (CAT) prévient la peroxydation des molécules biologiques induites par l'H₂O₂. L'activité catalase se fait selon la réaction suivante :



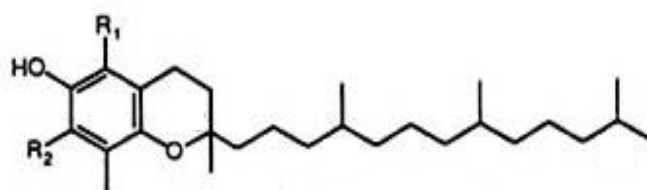
La catalase est une enzyme sensible à l'action des contaminants inducteurs de stress oxydatif comme les hydrocarbures, les polychlorobiphényles (PCB) et les pesticides telque le tetradifon (Shiyin, *et coll.*, 2004). La catalase évite que la concentration de H₂O₂ dépasse le niveau duquel il serait susceptible d'inactiver la SOD.

2.2. Systèmes de défense non enzymatiques

La vitamine A (rétinol) est un antioxydant, élément qui protège contre les maladies en neutralisant les molécules d'oxygène instables, les radicaux libres, du corps. Il semblerait que la rétinol permette de prévenir des cancers du sein.

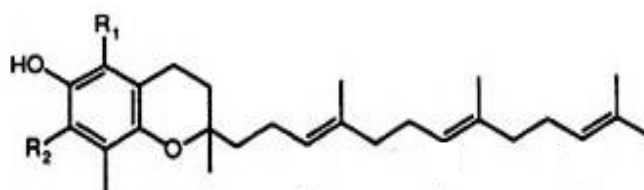
La vitamine C est primordiale à la formation et au maintien du collagène, protéine qui maintient les cellules du corps en place. Le collagène est indispensable aux os, aux dents et à la guérison des blessures.

La vitamine E est une vitamine liposoluble. Elle existe sous différentes formes chimiques (Figure 8). Le composé le plus actif est l'alpha tocophérol (scavenger). Elle se trouve dans tous nos tissus. La vitamine E est antioxydante, elle protège les acides gras poly-insaturés des membranes cellulaires de nos tissus contre les dommages de l'oxydation en neutralisant ces radicaux libres. Elle fonctionne de pair avec les autres anti-oxydants tels que les vitamines C et A et le sélénium. La vitamine E jouait un rôle préventif dans le développement des cancers et aurait un effet bénéfique sur les maladies cardiovasculaires en limitant les effets néfastes du cholestérol.



Tocophérol

	R ₁	R ₂
α	CH₃	CH₃
β	CH₃	H
γ	H	CH₃
δ	H	H



Tocotriénol

Figure 8 : Structures chimiques des tocophérols et tocotriénols

Il est fortement suggéré que la vitamine E ait un rôle préventif contre le cancer. Cependant, les données de la littérature se contredisent (Wu, *et coll.*, 2002, Virtamo, *et coll.*, 2003, Pham, *et coll.*, 2005, Cho, *et coll.*, 2006).

Une vaste étude clinique menée en Finlande et une étude épidémiologique indiquent que ces suppléments peuvent réduire le risque de cancer de prostate chez les fumeurs (Kirsh, *et coll.*, 2006). Un suivi de l'essai finlandais démontre que l'incidence du cancer de la prostate est revenue à la normale après l'arrêt de la vitamine E, ce qui signifie que, pour exercer son effet protecteur, la prise devrait être continue (Virtamo, *et coll.*, 2003).

L'effet préventif de la vitamine E est attribué à son activité antioxydante. En effet, la vitamine E se fixe au sein des membranes lipidiques grâce à sa longue chaîne lipidique, et c'est sa fonction phénolique qui est responsable de son activité antioxydante. Ainsi, sa présence permet la conservation de l'intégrité des lipides membranaires (Nemliche, *et coll.*, 2007). Il est possible que le tocophérol agisse également sur le plan hormonal, puisque la vitamine E abaisse le taux sanguin hormones stéroïdiennes notamment la testostérone et l'androstènedione (Hartman, *et coll.*, 2001). Dans deux études américaines, la prise de vitamine E est associée à la réduction de moitié des risques de cancer de l'oropharynx (GRIDLEY) et de 68% de cancer du côlon (BOSTICK).

Un essai clinique avec placebo de grande ampleur est en cours depuis 2001 afin de vérifier les effets préventifs du mélange vitamine E naturelle/sélénium sur le cancer de la prostate. Elle sera menée jusqu'en 2013 auprès de plus de 35 000 sujets (Klein, *et coll.*, 2003).

3. STRESS OXYDANT ET PATHOLOGIES

Les recherches menées au cours des dernières décennies ont montré que de nombreuses situations physiopathologiques, ainsi que les maladies osseuses et cancéreuses, seraient associées et favorisées par la production de radicaux libres lorsque cette production dépasse les capacités de défense anti-oxydantes, ce qui correspond alors à l'état dit de stress oxydant (McCord, *et coll.*, 2005, Muthusami, *et coll.*, 2005, Afonso, *et coll.*, 2007).

Pourquoi les craindre ? Parce qu'elles réagissent avec les tissus voisins causant des lésions oxydatives par extension de proche en proche. Elles s'attaquent aux composés vitaux des cellules (lipides, protéines, ADN), lésant ainsi :

- les acides nucléiques, par fragmentation et désordre de réplication de l'ADN, entraînant des mutations et des cancers.
- les structures lipidiques, ainsi que les composantes matricielles.
- les fibres de collagènes et donc la rigidité des tissus y compris l'os.

Ils sont aussi impliqués dans l'oxydation des protéines qui peuvent mener à leur fragmentation chimique, ou à leur susceptibilité accrue à l'attaque protéolytique.

3.1. Stress oxydant et intoxication aux pesticides

L'utilisation des pesticides dans notre environnement ainsi que leur présence résiduelle dans les aliments favorisent le stress oxydant (Bayoumi, *et coll.*, 2000). La vitamine E jouait un rôle très important contre le stress oxydant généré par les intoxications, notamment aux pesticides et aux métaux lourds (Nemmiche, *et coll.*, 2007).

3.2. Stress oxydant et cancer

Les relations entre stress oxydant et cancer s'avèrent très étroites, les ROS intervenaient dans l'activation des pro-oncogènes, amplifiant les signaux de prolifération et inhibant les gènes suppresseurs de tumeurs comme p53 (Yan, *et coll.*, 2002). Il a été démontré que le stress oxydatif stimule l'angiogenèse tumorale (Gerald, *et coll.*, 2004, Gerald, *et coll.*, 2005, Pouyssegur, *et coll.*, 2006).

Il paraît que la vitamine E jouerait un rôle dans la minéralisation et que son déficit provoquerait le début de maladies des os et du foie.

Matériel et méthodes

I- ANIMAUX ET TRAITEMENT :

1- Animaux et expérimentations :

1.1- Effets de l'intoxication par le tetradifon sur le microenvironnement osseux

Vingt- quatre rates femelles de souche Wistar pesant environ 190 g, provenant d'un élevage de l'Institut de Pasteur de Tunis (IPT). Celles ci ont été réparties en 4 lots (2 lots témoins et 2 lots traitées), pour étudier le microenvironnement osseux suite a l'intoxication par un pesticide a effet SERMs. Nous avons testé l'effet du tetradifon (Figure 9), fourni par SEPCM (Mégrine, Tunisie), après administration continue respectivement pendant 6 et 12 semaines à une dose cumulative de 2430 mg/kg de PC. Le mode d'exposition choisi est l'ingestion par voie orale du produit dilué dans l'eau de robinet. Le choix de la dose est basé sur des travaux antérieurs de Niepolomski et al. (Niepolomski, *et coll.* , 1972). Ces animaux ont été sacrifiés sous anesthésie par voie intrapéritoniale à l'aide d'une solution de Thiopental 5 mg/ml (Biochimie GmbH, Vienna Austria) à raison de 60 mg/kg de PC.

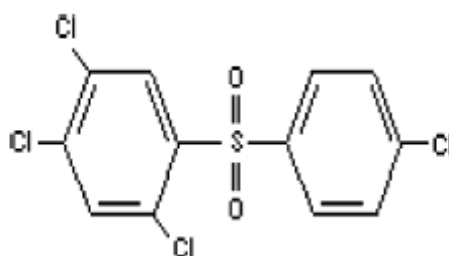


Figure 9 : Structure chimique du tetradifon ($C_{12}H_6Cl_4O_2S$)

1.2- Effet de la vitamine E sur des cellules Walker 256

Ces cellules sont réputées ostéophiles et génératrices de métastases osseuses ostéolytiques. Les cultures ont été réalisées dans des boîtes à 24 puits.

Un comptage cellulaire sur cytogramme, avec un test d'exclusion au bleu de trypan, ont été réalisés afin de déterminer le nombre de cellules vivantes. A J0, le taux de mortalité été de 1%. Les cellules, Walker 256, ont été cultivées dans des boites de cultures a 24 puits. La concentration de cellulesensemencée dans chaque puits a été de 5.10^4 cellules/ml. Avant

d'ajouter le produit de traitement, les boîtes ont été remises à l'étuve (5 % CO₂, 37° C) pendant 24h. Cette durée de « stabilisation » permet l'adhésion des cellules. Le lendemain, le milieu de culture de chaque puits a été remplacé par 1 ml de milieu neuf auquel a été ajouté ou pas de l'alpha tocophérol acétate, à raison de 0 ; 1,25 ; 2,5 ; 3,75 ; ou 5 µg/ml.

Le pourcentage d'apoptose et le dégagement de radicaux libres oxygénés (RLO) ont été quantifiés, par analyse d'image et mesure de fluorescence respectivement, après différentes périodes d'incubation avec l'alpha tocophérol acétate (24 ; 48 ; et 72 h). Pour chaque concentration en ATA et pour chaque durée d'expérimentation, l'étude a été réalisée en triplet.

1.3- Etude des métastases ostéolytiques

Cinquante- deux autres rats males de souche Sprague Dawley ont été utilisés pour l'étude des métastases osseuses ostéolytiques induites par l'injection *in situ* des cellules Walker 256/B. Ceux-ci ont réparties en 3 lots :

- 12 rats ont été opérés à blanc. Ces rats constituent le groupe témoin (SHAM).

- 20 rats ont reçu une injection intraosseuse de cellules Walker 256/B. Les rats ont été anesthésiés avec un mélange xylozine / kétamine et la patte arrière droite a été rasée. Une incision a été réalisée sur face extérieure de la patte en suivant l'axe du fémur gauche. Après écartement musculaire, le fémur a été foré au centre de la diaphyse grâce à une turbine de dentiste portant une mèche de 0,5 mm de diamètre. Le trou a été immédiatement rebouché par de la cire d'Horsley à travers laquelle 10⁴ cellules Walker 256/B ont été injectées à l'aide d'une seringue équipée d'une aiguille courbée (Figure 10). La plaie a été abondamment rincé avec du liquide physiologique puis refermée à l'aide d'agrafes. Ces rats constituent le groupe W256.

- 20 rats ont reçu, 6 jours/semaine, un gavage de l'alpha tocophérol acétate à raison de 45mg/Kg PC durant 20 jours. Une injection intraosseuse de cellules Walker 256/B (cf ci-dessus) a été réalisée. Ces rats constituent le groupe W256+ATA.

Les différents lots des rates ont été placés dans des cages standards à une température constante de 24°C et soumis à des cycles réguliers de 12 h d'obscurité / 12 h de lumière, et acclimatées à l'animalerie pendant 15j avant le début de l'expérimentation.

Après 20 jours, les rats servant à l'étude de métastases ostéolytiques ont été sacrifiés et des échantillons biologiques ont été prélevés (fémurs, rein, sang, urines, foie). Cette durée a été choisie vue qu'une étude préliminaire a montré que l'injection *in situ* des cellules Walker

256/B abouti a une perte osseuse trabéculaire très importante avec effraction corticale très avancée 30 jours (Blouin, *et coll.*, 2006).



Figure 10 : Photographie de l'inoculation intra osseuse des cellules tumorales.

2- Obtentions d'ascites :

Pour l'étude des métastases osseuses, Des cellules tumorales Walker 256, préalablement cultivées *in vivo*, puis passées deux fois de suite dans la cavité péritonéale de l'animal pour un développement en ascite après injection intrapéritonéale. La durée de chaque ascite est de ~ 6 jours. Les différences de phénotypes entre les cellules Walker 256 en culture et celles après passages *in vivo* ont été identifiées par électrophorèse bidimensionnelle.

3- Sacrifices, prélèvement et préparation d'échantillons prélevés pour les analyses :

Les sacrifices ont été réalisés dans des pièces annexées, dans les mêmes conditions expérimentales pour éviter tout agent stressant et toujours dans la même période de la journée pour éviter les variations dues au rythme circadien.

3.1- Urines :

Des échantillons d'urine des rates ont été collectées et utilisés pour la détermination des paramètres urinaires.

3.2- Sang :

Pour chaque rate un volume sanguin est prélevé par aspiration lente à l'aide d'une seringue placée dans le cœur (ventricule) de l'animal. Selon le type d'analyse, les prélèvements sont récupérés dans différents tubes à hémolyse soit :

- Sur héparine et sans centrifugation qui nous a servi aux études cytogénétiques.
- Sans anticoagulant avec centrifugation de l'ordre de 4000trs/min pendant 15 min. Les sérums ont été conservé à -20°C pour des dosages ultérieurs de certains paramètres biochimiques.

3.3- Foies et reins :

Les foies et les reins sont destinés à des études histologiques, histochimiques sont prélevés et immédiatement fixés dans le formol 10%. Pour l'étude de l'effet du tetradifon sur la balance oxydative/antioxydative, quelques fragments du lobe inférieur du poumon gauche et du foie, l'ovaire gauche et le rein gauche sont broyés pour le dosage des TBARS.

3.4- Fémurs

Les fémurs des membres droits sont nettoyés puis fixés soit au BB'S pour servir à la confection des coupes de tissus osseux inclus en résine méthacrylique, soit au glutaraldéhyde pour l'étude en microscopie électronique à balayage.

Des fémurs des rats destinés à l'étude des métastases osseuses, ont servi à l'évaluation du statut oxydatif dans le microenvironnement osseux.

5.5- Moelle osseuse :

De la moelle osseuse a été prélevée par ponction sur les têtes fémorales pour : (i) étudier la génotoxicité du tetradifon par des tests cytogénétiques (SCEs : échanges survenue entre les chromatides sœurs et CAs : aberrations chromosomiques), (ii) étudier l'état du stress oxydatif dans le microenvironnement médullaire avec des foyers tumoraux.

II- TECHNIQUES D'HISTOLOGIE :

1- Microscopie optique standard pour les parties molles:

Dans le but d'empêcher l'autolyse des tissus et de les maintenir dans un état proche de l'état vivant, on a utilisé pour la fixation le formol à 10%. Après 24H, les fragments tissulaires ont été plongés dans un bain de formol, d'alcool et de toluène et de paraffine liquide. Ces différentes étapes de la circulation étaient réalisées par un appareil automatique programmable : l'histokinet.

L'inclusion (enrobage) est faite en plaçant les fragments dans des moules en plastique (Peel-a-way) préalablement remplis de paraffine liquéfiée à 56°C. Des coupes fines de 3-4µm d'épaisseur environ ont été confectionnées. Le microtome utilisé est de type HM314 avec des lames de rasoir métalliques jetables (Jung Leica). Les coupes récupérées sont déposées sur une lame de verre partiellement couverte d'une solution d'albumine à 0,1%, puis les coupes étaient ramenées à l'étuve à 37°C. Le lendemain, les coupes ont été déparaffinées dans deux bains successifs de toluène, puis leur réhydratation dans deux bains successifs d'alcool à concentration décroissante (100% et 95%) puis à l'eau de robinet. Puis les différentes coupes sont colorées à l'hématoxylline-éosine, une coloration histochimique supplémentaire au P.A.S. a été également réalisée pour chaque prélèvement.

2- Microscopie optique des pièces osseuses sans décalcification

2.1- Fixation et infiltration :

Après prélèvement, les pièces osseuses sont fixées dans le BB'S pendant 24 heures, transférées ensuite dans des tubes de verre avec bouchon en bakélite vissé, déshydratées dans des bains d'acétone et infiltrées par l'MMA (méthyl-méthacrylate) par agitation constante avec l'agitateur rotatif en vitesse lente. La durée des bains est de 1 heure avec un volume de 5 ml environ. Tous les bains sont réalisés à température ambiante à l'exception du dernier bain d'infiltration qui doit être pratiqué à -20°C pendant une nuit.

2.2- Inclusion et démoulage des blocs :

Elle consiste à transvaser le bain de la veille dans un godet en plastique (Peel-A-Way). La polymérisation s'effectue progressivement à 4°C.

La pièce est déposée sur un petit fragment de mousse polyster, recouverte du mélange d'inclusion de façon à former un ménisque. Le prélèvement est identifié avec une étiquette portant la référence de la pièce. Le godet est ensuite bouché et deux plaques de verre sont posées sur le bouchon, l'ensemble permet de créer une atmosphère anaérobie nécessaire à la polymérisation. Les godets sont enfin placés dans le réfrigérateur et de l'eau est mise dans le plateau jusqu'à mi-hauteur du godet ce qui permet de limiter le pic thermique obtenu au cours de la polymérisation. Le lendemain les blocs peuvent être démoulés et coupés.

2.3- Coupe des blocs :

Sur les pièces osseuses incluses, des coupes sériées sont réalisées à l'aide d'un microtome Polycut S Reichert Jung équipé d'un rasoir au carbure de tungstène. Les coupes sont

récupérées dans l'eau à l'aide d'une bande de papier humide, bande de la largeur de la coupe. Des coupes de 7 µm d'épaisseur sont réalisées sur des étages différents de la façon suivante : une coupe pour la coloration de Goldner et une autre pour la coloration au Giemsa. On débite ensuite 30µm d'épaisseur du bloc sur lequel aucune coupe n'est récupérée puis on répète 4 fois cette opération en récupérant chaque fois une coupe.

Les coupes sont colorées puis montées au Néontellan après déshydratation. Les lames sont ensuite serrées à l'aide de pinces en bois pour limiter au maximum le phénomène de plissement. La procédure suivie est celle décrite par (Chappard, *et coll.*, 1987).

2.4- Colorations :

2.4.1- Trichrome de Goldner modifié :

Elle est basée sur la détection du tissu ostéoïde et du tissu minéralisé. La technique est la suivante :

Incuber les coupes au moins pendant 1H dans l'acide picrique saturé, rincer abondamment dans l'eau distillée. Colorer dans l'Hémalum de Meyer pendant 15min, puis différencier l'Hémalum de Meyer dans une solution d'acide chlorhydrique 0,1N (3,6%) jusqu'à ce que l'os ait pris une teinte rose pâle. Rincer à l'eau courante puis virer l'Hémalum de Meyer au bleu dans le carbonate de lithium, ainsi les noyaux de la coupe prennent alors une teinte bleuâtre. Rincer de nouveau à l'eau courante. Colorer pendant 20min dans une solution de Fushine Ponceau. Rincer à l'eau acétifiée, placer les coupes pendant 6min dans l'acide phosphomolybdique-Orange G pour décolorer partiellement les tissus osseux qui était rouge (agiter les coupes de temps en temps). Ensuite bien égoutter les coupes sans rinçage les colorer pendant 15min dans le fast green FCF 0.1%. Rincer 2 à 3 fois dans l'eau acétifiée, déshydrater les coupes dans 3 bains de 2-propanol puis 2 bains de méthylcyclohexane. Enfin montage au Néontellan.

2.4.2- Détection histoenzymatique de la TRAcP :

Cette réaction se base sur la détection de la TRAcP contenue dans les ostéoclastes responsable de la résorption osseuse. La technique colore les ostéoclastes en rouge et l'os en bleu.

2.4.3- Coloration au Giemsa fast :

Le Principe est basé sur la coloration cellulaire dont la technique est la suivante : plonger les coupes pendant 10min dans une solution de May Grunwald, les rincer à l'eau de robinet puis 20min dans Giemsa (10%). Passer dans 3 bains de 2-propanol puis 2 bains de méthylcyclohexane. Enfin montage au Néontellan.

III- METHODES BIOCHIMIQUES:

1- Techniques de chromatographie pour le dosage des vitamines :

L'extraction des échantillons sanguins pour dosage de vitamines A et E se fait en cinq étapes : la déprotéination du plasma par 200µl d'éthanol. Extraction du mélange (α -tocophérol et rétinol) obtenu par le n-hexane, puis évaporation sous courant d'azote hexanique. Ensuite reprise de résidu sec par 250µl de méthanol pur, et enfin l'injection dans le système chromatographique de 50µl de l'extrait.

La technique de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) utilisée pour le dosage des Vitamines A et E est une chromatographie en phase inverse et en mode isocratique. La phase mobile est formée d'un mélange (méthanol/n-butanol/eau) (V/V/V ; 89,5/5/5). L'étalon interne utilisé est le rétinyl acétate. L'élution de la phase mobile a été faite à un débit de 1,7 ml/min, en utilisant une colonne C18 (L=15cm ; DI=4,6mm).

La détection a été réalisée par spectrophotométrie ultra violette (UV) avec une commutation de longueur d'onde 325 à 340 nm pour le rétinol acétate et $\lambda = 292\text{nm}$ pour l' α -tocophérol.

2- TBARS tissulaire

2.1- Principe

Décrite par Kohn et Liversedge en 1944, précisée par Patton et Kuntz en 1951, la réaction de dosage de malondialdéhyde (MDA) tissulaire adoptée pour les différents organes, repose sur la formation en milieu acide (pH 2-3) et à chaud (90 °C-100 °C) entre le MDA et deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) ; d'un pigment rose absorbant à 532 (Esterbauer, *et coll.*, 1990) La réaction au TBA est une méthode très sensible permettant de détecter les faibles quantités de peroxydation lipidique en particulier le MDA libre. Notant que le complexe 2 TBA-MDA n'est stable que pendant 3 heures à l'abri de la lumière et à température ambiante.

2.2- Technique :

- Broyage à froid de l'échantillon tissulaire à l'aide d'un broyeur Ultra Turrax Tenebroek (1g de tissus + 10ml de KCl 1.15%) a fin d'obtenir un homogénisat tissulaire. Puis prélever 200µl de l'homogénéisat préparé. Ajouter 200µl de SDS (sodium dodécyl sulfate) 8.1%, 1.5 ml d'acide acétique 20% (pH=3.5 ajusté avec du NaOH), 1.5 ml d'une solution aqueuse d'acide thiobarbiturique (TBA 0.8%) et 800 µl d'eau distillée (QSP 4ml).

- Porter le mélange au bain marie à 95° pendant 30min puis refroidir à l'eau courante. Ensuite ajouter 1ml d'eau distillée et 5ml d'isobutanol-pyridine (15/1).
- Après centrifugation des tubes à 4000trs/min pendant 15min, prélever le surnageant pour y déterminer la DO à 532 nm. Enfin, convertir au terme concentration de MDA.

2.3- Courbe d'étalonnage :

Pour assurer le dosage de MDA nous avons réalisé au paravent une solution de TEP à 10mM (1,1,1,3-tetra-ethoxypropane) de formule chimique $(C_2H_5O)_2$ et de poids moléculaire 220.31g. Le MDA étant un composé instable, la gamme d'étalonnage a été établie à partir d'une solution fille diluée 500 fois obtenues à partir de la solution mère de TEP. Des solutions étalons à des concentrations croissantes (0, 4, 8, 12, 16, 20 nM) ont été préparées. Notant que le dosage s'effectue en double sur tous les extraits tissulaires d'échantillon d'organes prélevés et des étalons de TEP.

3- Dosage de l'activité de la catalase (CAT):

L'activité catalase a été exprimée en $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ hydrolysées/min/mg de protéine en se basant sur la détermination du peroxyde d'hydrogène selon la procédure de Beers and Sizer (Beers, *et coll.*, 1952).

La densité optique (DO) a été mesurée à une longueur d'onde de 240nm. Notant que la lecture de l'absorption se fait après 15 secondes de délai et pendant 60 secondes de mesures.

4- Dosage de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) :

Il s'agit d'une méthode de photoréduction, ainsi la réduction du cytochrome C par l'anion superoxyde est utilisée comme base de détection de la présence de SOD (McCord, *et coll.*, 1969). La DO a été déterminée à une longueur d'onde de 505 nm.

5- Dosage de l'activité de la glutathione peroxydase (GPx) :

Il s'agit de mesurer, à une longueur d'onde de 340 nm, la quantité de glutathion oxydé en suivant la décroissance d'absorption du NADPH (Beutler, 1975).

6- Dosage des carbonyles :

Les échantillons ont été traités selon la procédure de Fagan et coll. (1999) qui s'effectue à l'aide du DNPH. Le dosage des contenus en carbonyles s'effectue par spectrophotométrie et la DO a été déterminée à une longueur d'onde de 505 nm.

7- Dosage de la créatinine sérique :

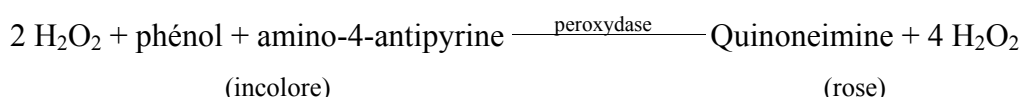
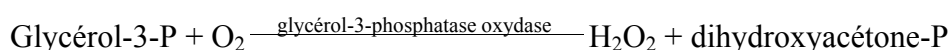
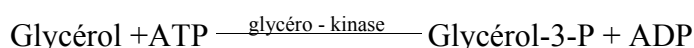
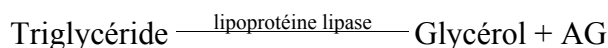
Il s'agit d'un dosage spectrophotométrique qui s'effectue à l'aide des coffrets Merck (A 0229812 x 120ml et 024846 x 500 ml). Après déprotéinisation sulfotungstique en milieu alcalin, la créatinine réagit avec le picrate ce qui aboutit à une coloration jaune orangée détectable au spectrophotomètre ($\lambda = 510 \text{ nm}$).

8- Dosage des triglycérides :

Ce dosage a été réalisé par la méthode enzymatique à glycérol kinase (SPINREACT® Spain).

5.1- Principe :

Le principe se base sur la cascade de réactions suivantes :



5.2- Mode opératoire :

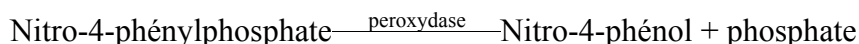
Ajouter 10 μl de la solution étalon de glycérol (R3 à 2,28mmol/l) 10 μl de l'échantillon et 1 ml de solution RA (mélange de réactifs R1 et R2). Vortex puis incuber à 37 °C pendant 5 min. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de triglycéride.

$$[\text{TG}] = \text{DO éch} / \text{DO étal} \times [\text{étalon}]$$

6- Dosage des phosphatases alcalines :

6.1- Principe :

Les phosphates alcalins sont des enzymes pouvant catalyser les réactions suivantes :



La réaction est effectuée en tampon amino-2-méthyl-2-propanol-1 à pH 10.5. On étudie la variation de la densité optique à 504 ou 410 nm par minute, c'est à dire la variation de la concentration de phénol par minute. Le dosage s'effectue par un coffret **Fluitest® ALP**.

6.2- Mode opératoire :

Introduire dans un tube thermostaté à 30 °C : 3 ml de réactif (R'1+R'2) et 0.1 ml de sérum. Mélanger pendant une minute puis mesurer l'augmentation de la DO/mn (n), de 1 à 3 mn.

7- Dosage du statut antioxydant total (TAS) :

Le statut antioxydant total (TAS) fait inclure une large gamme d'antioxydants pour prévenir et réduire la peroxydation lipidique, telle que la β -carotène, la vitamine E, acide ascorbique, la bilirubine ...

Ce paramètre a été mesuré par un kit commercialisé (Randox Laboratories, Crumlin, UK, ref : NX2332). Le kit a été utilisé selon le protocole établi par le fabricant.

8- Dosage du calcium et du phosphore :

8.1- Calcium et phosphore sérique :

Les taux sérique en calcium et en phosphore en été réalisés par méthode colorimétrique en utilisant deux kits commercialisés (Biomerieux France, ref : 61041 et 61571). Les kits ont été utilisés selon les protocoles établis par le fabricant.

8.2- Calcium et phosphore osseux :

Des échantillons de fémurs prélevés ont été desséchés dans une étuve réglée à une température de 80°C jusqu'à l'obtention d'un poids sec constant. Après dessèchement, ces échantillons ont été placés dans des tubes à essai en présence d'acide nitrique (1ml d'acide pour 50 mg d'os sec). Ces échantillons ont été soumis à une attaque acide à froid pendant 24 heures puis une attaque à chaud pendant 2 heures dans un bain à sec réglé à 148°C. Afin d'éliminer la quantité résiduelle d'acide qui peuvent gêner le dosage, de l'eau déminéralisée a été additionnée au contenu des tubes après minéralisation à la même température. Après refroidissement, le minéralisât a été filtré à l'aide d'un papier filtre et le volume final a été ajusté à 50 ml.

Les minéralisats obtenus ont servi pour la détermination des taux du calcium et du phosphore (Ca^{2+} et PO_4^{3-}) contenus dans les échantillons des fémurs ont été déterminés par spectrophotométrie. Pour cela, nous avons utilisé deux coffrets Biomagreb (Tunisie, réf : 20051 ; et réf : 20081) pour le dosage des ions calciums et les ions phosphates respectivement.

8.2.1- Dosage des ions calcium (Ca^{2+})

Le dosage colorimétrique du calcium a été réalisé en présence d'un complexe orthocrésolphtalénine. En milieu alcalin, le calcium forme avec le complexe crésolphtaléine un composé coloré en violet dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en calcium.

8.2.2- Dosage des ions phosphates (PO_4^{3-})

Pour le dosage de phosphore, le complexe phospho-molybdate (Molybdate d'ammonium + acide sulfurique) est réduit en milieu alcalin en complexe phosphomolibdique de couleur bleue dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en phosphore.

IV- CULTURE CELLULAIRE ET TECHNIQUES DE CYTOGENETIQUE CONVENTIONNELLE :

1- Lignées cellulaires et conditions de culture

1.1- Les cellules de la moelle osseuse

Nous avons utilisé dans notre travail des cultures de la moelle osseuse, dans des tubes à fond conique de 15 ml en utilisant un milieu de culture RPMI 1640 au quel a été préalablement ajouté 1% du Penicilline-Streptomycine, 0.5 % L-glutamine 5% de sérum de veau fœtal. La mise en culture de la moelle a été réalisée à 37°C dans un incubateur humide avec 5 % de CO₂.

1.2- Les cellules Walker 256

Les cellules Walker 256/B ont été cultivées dans des boîtes 75 cm² dans du Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) contenant 10 % de sérum de veau fœtal, 1% L-Glutamine, 1 % de pénicilline / streptomycine sulfate, 1% d'acides aminés non essentiels et 1 mM de sodium pyruvate.

Les cellules ont été cultivées à 37°C dans un incubateur humide avec 5 % de CO₂.

2- Test d'aberrations chromosomiques:

Après la culture cellulaire, la préparation des chromosomes métaphasiques nécessite des techniques cytogénétiques qui se résument en 4 étapes : L'arrêt des mitoses au stade de métaphase. L'éclatement des mitoses par un choc hypotonique. Suivi d'une fixation des préparations (2 à 3 fixations). Et l'étalement des cellules sur lames.

2.1- Arrêt des mitoses à la métaphase :

Quelques temps avant la fin du temps de culture, ajouter 60µl de colcémid réchauffé à 37°C, puis incuber de nouveau pendant 45 min à 37°C. Ensuite centrifuger à 1500trs/min pendant 5 min, enlever le surnageant et enfin suspendre au vortex.

2.2- Eclatement des mitoses par choc hypotonique :

Pour éclater les mitoses ajouter doucement 7ml le choc KCl 0.075M réchauffé (37°C). Suspendre au vortex, puis incubé ouvert à 37°C pendant 25 min.

2.3- Fixation des préparations :

Il s'agit de centrifuger à 1000 trs/min pendant 5 min, d'enlever le surnageant, et rajouter 7 ml de fixateur (3V méthanol/1V d'acide acétique) préparée extemporanément. Puis centrifuger de nouveau pendant 5 min à 1000 trs/min. Cette étape se fait 2-3 fois.

2.4- Etalement des mitoses :

Cette étape doit être réalisée dans une pièce à humidité de 50% au minimum. Aspirer le surnageant, puis ajouter 1 à 2 ml de fixateur selon le culot. Étaler deux gouttes sur des lames 'superfrost'. Après séchage de 15 min, colorer au Giemsa.

Les mitoses sont ensuite analysées, digitées, au microscope Axioscop 2 plus Zeiss menée d'une camera AxioCam HRm Zeiss.

3- Test d'échange des chromatides sœurs (SCE) :

Ce test nécessite la préparation des chromosomes qui se fait de la même manière que celle décrite précédemment pour les aberrations chromosomiques. Cependant au cours de la mise en culture, on ajoute d'emblée de la BrdU à raison de 10 µg/ml soit 100% de la solution préparée.

Un microscope Leica DMR D équipé d'un appareil photo numérique a servi à imager les mitoses et à sauvegarder les images sous forme de fichier JPEG. Les fichiers JPEG ont été analysés, pour déterminer le pourcentage de lésions par les méthodes des aberrations chromosomiques (CAs) et des échanges survenues entre les chromatides sœurs (SCEs).

4- Test d'Apoptose : Hoechst 33342 assay

Un comptage cellulaire sur cytogramme, avec un test d'exclusion au bleu de trypan, a été réalisé afin de déterminer le nombre de cellules Walker 256/b vivantes. A J0, le taux de mortalité été de 1%. Les cellules, Walker 256, ont été cultivées dans des boîtes de cultures à 24 puits. La concentration de cellules déposées dans chaque puits a été de 5.10^4 cellules/ml. Avant d'ajouter le produit de traitement (l'alpha tocophérol acétate), les boîtes ont été remises à l'étuve (5 % CO₂, 37° C) pendant 24h. Cette durée de « stabilisation » permet l'adhésion des cellules. Le lendemain, le milieu de culture de chaque puits a été remplacé par 1 ml de milieu neuf auquel a été ajouté ou pas de l'alpha tocophérol acétate, à raison de

0 ; 1,25 ; 2,5 ; 3,75 ; ou 5 µg/ml. Pour chaque concentration en ATA, l'étude a été réalisée en triplet pour différentes périodes d'incubation : 24 ; 48 ; et 72 heures.

La mise en évidence de l'apoptose a été réalisée par coloration au Hoeschst H33342. Ce colorant se fixe aux zones riches en A-T de l'ADN ce qui fait un colorant spécifique du noyau et donc un bon moyen pour mettre en évidence les noyaux apoptotiques. Les cellules en apoptose présentent une chromatine condensée donc un noyau très fluorescent.

5- Test DCFH-DA

Le dégagement de radicaux libres oxygénés (RLO) été quantifiés, par analyse d'image et mesure de fluorescence par un test à la 2,7 dichloro-dihydrofluoresceine diacétate (DCFH-DA). Vu la durée de vie très courte, des RLO, nous avons choisi de doser le H₂O₂ qui es un produit secondaire de formation. La DCFH-DA peut facilement franchir les membranes cytoplasmiques des cellules où elle sera déacétylée, sous l'action des estérases membranaires, en dichlorofluoresceine (DCFH) qui n'émet pas de fluorescence. Sous l'effet des RLO, la DCFH est elle-même oxydée en dichlorofluoresceine (DCF), composé fluorescent. L'intensité de fluorescence a été mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre (TECAN).

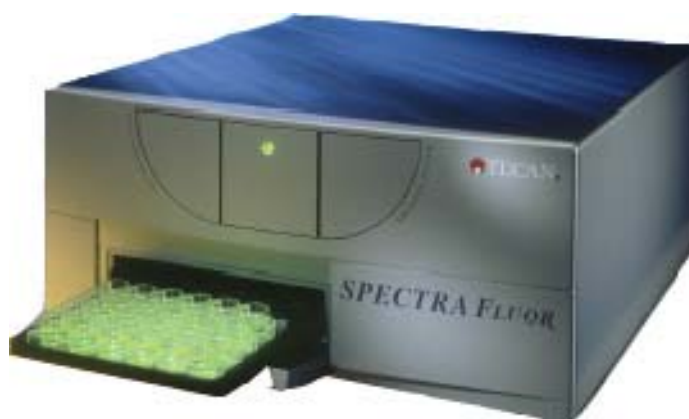


Figure 11 : Photographie du lecteur de microplaques (SPECTRA Fluor Plus, TECAN) permettant la mesure de l'intensité de fluorescence

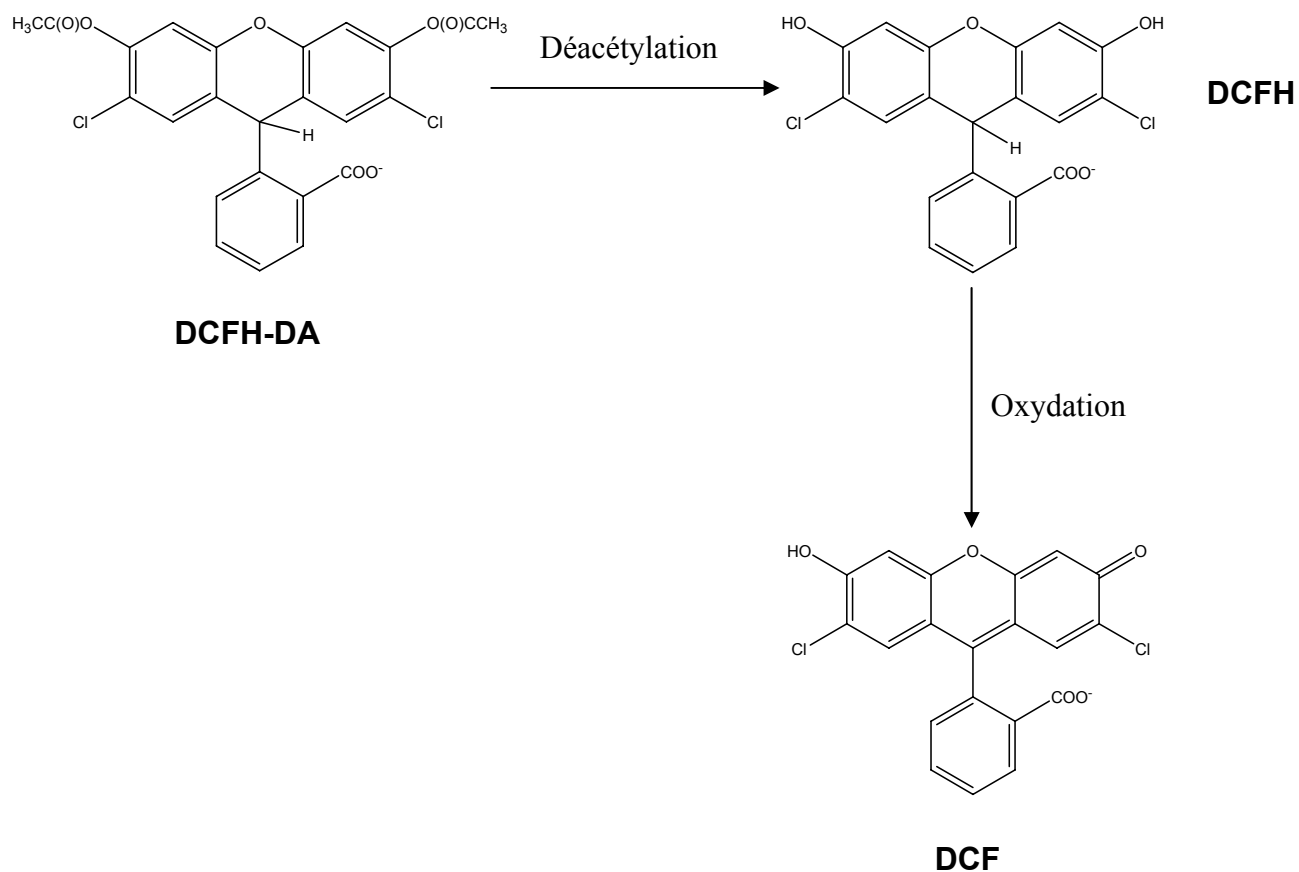


Figure 12 : Mécanisme d'oxydation de la DCFH-DA : la DCFH-DA pénètre facilement dans la cellule où elle sera déacétylée par les estéréases membranaires en DCFH, cette dernière sera oxydée par les radicaux libres oxygénés en DCF, composé fluorescent.

V- EXPLORATION HISTOMORPHOMETRIQUE DES PIÈCES OSSEUSES :

L'histomorphométrie est la méthode de choix pour la compréhension de la physiologie et la physiopathologie du remodelage osseux. Les échantillons d'os prélevés chez les rats, ont été étudiés sans préalable décalcification après inclusion dans une résine méthacrylique. C'est une méthode quantitative, qui est la seule qui permet d'évaluer à la fois l'activité cellulaire et tissulaire *in vivo*. L'analyse inclue des paramètres statiques, dynamiques, et architecturaux. Différents paramètres ostéoïdes, corticaux, et trabéculaires peuvent être envisagés selon une technique récemment publiée.

- Volume osseux trabéculaire (BV/TV, %) qui représente le pourcentage du volume de la pièce osseuse occupé par les travées.
- Tb.Th (trabecular thickness, μm) qui représente l'épaisseur des travées.
- Tb.N (trabecular number, /mm) qui représente le nombre de travée.
- Tb.Sp (trabecular separation, μm) qui représente l'espace entre les travées dans le tissu osseux.

VI- RADIOGRAPHIE A RAYONS X

La radiographie a rayons X a été réalisée à l'aide d'un système Faxitron X-ray (Edimex, Angers, France) équipé d'un caméra (5X5 CCD). Le voltage été fixé à 30KV, 30mA.



Figure 13 : Photographie du système Faxitron Model MX-20

VII- MICROTOMOGRAPHIE A RAYONS X

La microtomographie est utilisée dans différents domaines (Eberhardt, 2002). En biologie, elle est parfaitement adaptée pour l'étude des tissus durs grâce à un fort coefficient d'atténuation linéaire des tissus osseux calcifiés et des dents (Davis, *et coll.*, 1996).

1- Principe d'acquisition et de reconstruction

L'exploration des coupes histologiques pour des informations 3D, obtenues et en reportant les contours de l'objet sur des plaques de carton ou de cire, qui, après découpage et empilement, constitue une méthode est très lourde et, de plus, n'est pas très fiable car la structure de l'objet peut facilement être altérée.

Le système tomographique à rayons X Skyscan 1072 (Skyscan - Aartselaar, Belgique) permet de reconstruire de manière non destructive la structure tridimensionnelle de petits objets à partir de radiographies bidimensionnelles.

Les coupes sériées, ainsi obtenues, peuvent servir à la construction tridimensionnelle de l'objet. La reconstruction tridimensionnelle, à partir de projections 2D, a été résolue en utilisant la technologie « cone beam » qui consiste à effectuer de multiples radiographies en projection de l'objet, décalées d'un angle faible. En utilisant les données des images de projection, des coupes 2D sont reconstruites. Ceci permet d'obtenir un lot de sections de l'objet empilées informatiquement, pour former un modèle tridimensionnel. Divers manipulations et analyses (coupes, déplacement...) de l'objet 3D, ainsi obtenu, peuvent être employées en réalité virtuelle.

Nous avons utilisé le logiciel ANT (Skyscan - Aartselaar, Belgique) qui utilise la technologie de « surface rendering » après un seuillage interactif des contours des structures à reconstruire.

Les fémurs ont été placés dans des tubes Eppendorf contenant de l'eau afin de ne pas entraîner de dessiccation. Les tubes ont été fixés sur le support rotatif du microtomographe par de la pâte à modeler. Une radiographie préalable de positionnement a été alors réalisée avant le début des acquisitions.

A partir des images TIFF obtenue par l'acquisition, un seuillage des niveaux de gris a été déterminé pour éliminer le bruit de fond et sélectionner les structures minéralisées. La reconstruction des coupes d'os a été réalisée en appliquant ce seuil sur l'ensemble des

coupes. La zone d'intérêt étudiée a été fixée à 300 coupes au-dessus de la perforation du fémur.

2- Apport biologique de la méthode

La microtomographie a été employée dans des cadres divers (Chappard, *et coll.*, 2005). L'avantage de la méthode est d'effectuer des mesures à partir des modèles 3D. Une corrélation significative a été rapportée entre les mesures histomorphométriques (tels que le BV/TV, Tb.Th, Tb.N, Tb.Sp, ...) et microtomographiques (Chappard, 2002 ; Muller, 1998). Cependant la microtomographie semble surestimer les mesures de volume osseux.

Par ailleurs, la microtomographie fournit d'autres paramètres supplémentaires permettant une meilleure appréciation de la qualité de l'architecture 3D des pièces osseuse. Il s'agit de :

- Structure Model Index (SMI) qui permet d'apprécier l'aspect architectural du réseau trabéculaire, en y mesurant la proportion relative de piliers et de plaques. Le réseau trabéculaire est uniquement constitué de plaques si le SMI est égal à 0 et uniquement de piliers si le SMI est égal à 3 (Jinnai, *et coll.*, 2002).
- Degré d'anisotropie (DA) permet d'apprécier la présence ou l'absence d'alignement préférentiel des travées osseuses selon un axe directionnel particulier c'est-à-dire l'obéissance à la loi de Wolff (Odgaard, 1997). Une des limites de la méthode, c'est qu'elle ne donne aucun renseignement concernant les activités ostéoblastiques et ostéoclastiques, ni sur le volume et l'espace du tissu ostéoïde.



Figure 14 : Photographie du micro-scanner (Skyscan 1072) permettant l'analyse microtomographique a rayons X

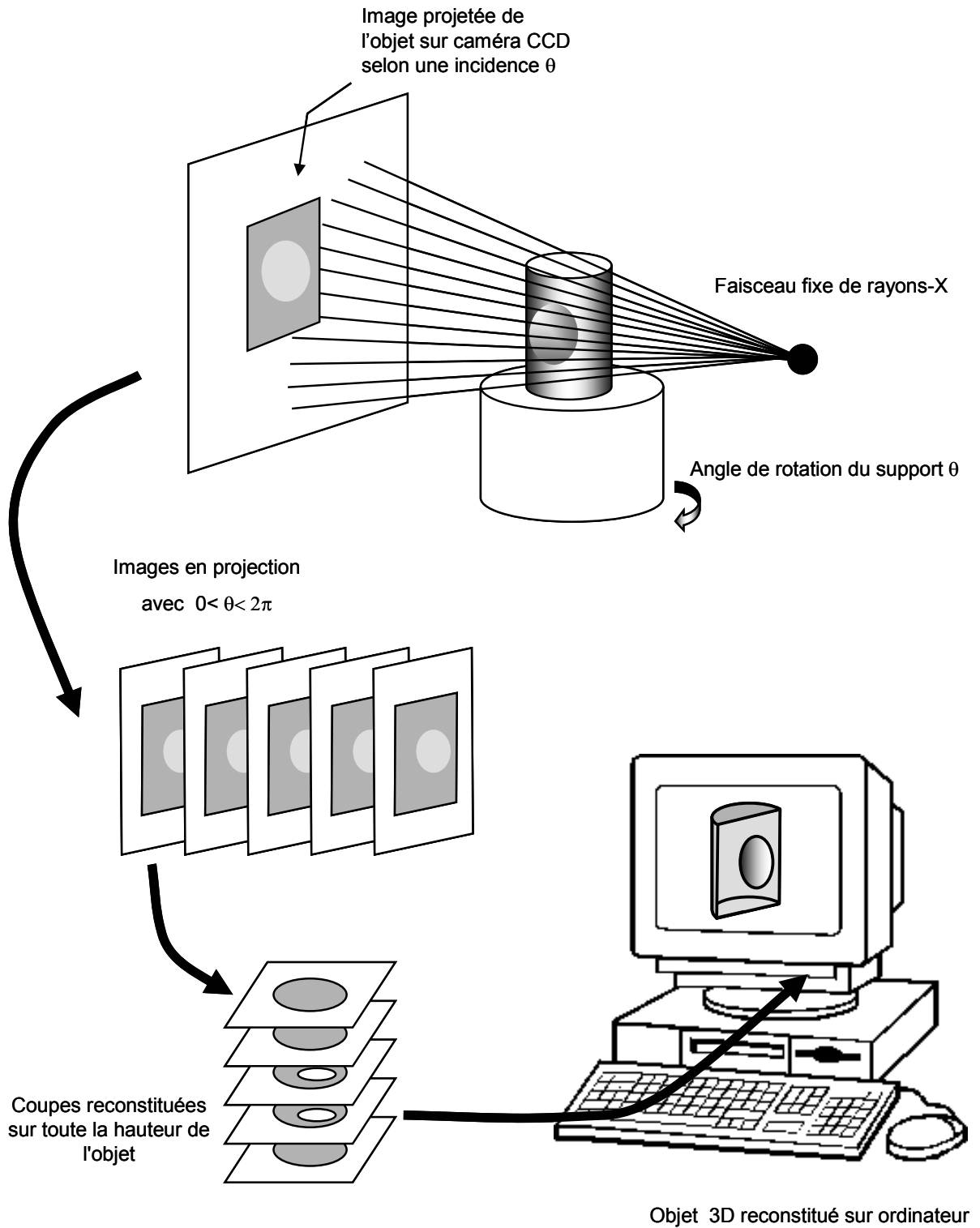


Figure 15 : Schéma du principe d'acquisition d'un échantillon par microtomographie X en mode cone-beam

VIII- MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE :

L'analyse au MEB a été pratiquée pour le fémur de chaque rate selon le protocole décrit par (Libouban, *et coll.*, 2001). Ainsi les échantillons ont été coupés longitudinalement à l'aide d'un bistouri, immergés dans l'hypochlorite de sodium (50%) pendant 3H pour éliminer la matière organique, puis rincés dans l'eau distillée pendant 30 min. Cette étape est suivie d'une fixation à 1% d'acide osmique dissous dans un tampon cacodylate (0.1M) de pH égale à 7.2. Le lendemain les échantillons sont rincés de nouveau dans l'eau distillée pendant 30 min, déshydratés dans une série croissante d'éthanol (70°, 95°, 100°) ensuite déshydratés dans 2 bains d'hexaméthylidizilazine pendant une heure puis séchés à l'air libre, et analysés au MEB (MEB Philips série XL 30). Ainsi plusieurs images contrastées, contenant des informations, peuvent être réalisées. Des images secondaires utilisant la détection des électrons secondaires (SE) permettant un contraste à deux origines : topographie et structure chimique. D'autres en rétrodiffusés utilisant la détection rétrodiffusée (BSE) présentant plutôt la composition chimique.

IX- TRAITEMENT STATISTIQUE DES RESULTATS :

L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel PRISM, version 11 (SPSS Inc. Chicago, IL). Tous les résultats obtenus ont été exprimés en moyenne \pm erreur standard de la moyenne (SEM). Les différences entre groupes ont été testées par analyse de variance (ANOVA). Une différence a été considérée comme statistiquement significative pour une valeur p inférieure à 0,05.

Résultats

Article 1

**EFFET DE L'EXPOSITION SUBCHRONIQUE AU TETRADIFON
SUR LE REMODELAGE ET LE METABOLISME OSSEUX
CHEZ LA RATE FEMELLE**



Effect of subchronic exposure to tetradifon on bone remodelling
and metabolism in female rat

R. Badraoui, N.B Abdelmoula, Z. Sahnoun, Z. Fakhfakh, T. Rebai
C. R. Biologies. 330:897-904(2007)

Le but de cette étude était d'apprécier l'impact du tetradifon, a effet *estrogen-like*, sur le tissus osseux : l'impact sur le remodelage osseux et la composition minérale de l'os chez des rates femelles pubères. Une dose cumulative de 2430 mg/kg PC a été testée sur des rates qui ont été sacrifié après 6 ou 12 semaines d'exposition. La formule chimique détaillée de ce composé figure dans le chapitre matériel et méthodes et dans le corps des articles 1 et 2.

Le remodelage osseux a été étudié par analyse histomorphométrique et par microscope électronique à balayage (MEB, SEM Philips series XL30) selon la technique décrite par Libouban (Libouban, *et coll.*, 2001) Le sérum et le fémur droit ont été objectivés pour la détermination du taux de phosphatases alcalines (AlkP) et/ou des teneurs en calcium et en phosphore.

Nous avons montré que le tetradifon ne parait pas avoir un effet délétère franc sur le remodelage osseux. En effet, l'analyse des images d'os réalisée en utilisant le MEB n'a pas montré d'altération structurale au niveau de l'organisation générale des pièces fémorales chez les rates traitées. Cependant, nous avons noté chez les groupes traités une augmentation de la distance intertrabéculaire, avec un aspect moucheté de l'endoste, qui pourrait être expliqué par une perturbation du remodelage osseux, avec un retard d'ossification (Figure 16).

Parallèlement, l'examen histologique mené sur des pièces osseuses incluses dans du méthyle méthacrylate sans préalable décalcification, coupées et colorées au trichrome de Goldner, TRAcP, et Giemsa a montré un aspect normal (Figure17). Cependant, l'étude histomorphométrique a montré une augmentation significative de l'épaisseur des trabécules (Tb.Th) et la surface ostéoïde (OS/BS) (Tableau 5).

Par ailleurs, nous avons noté, après 12 semaines de traitement, une augmentation significative ($p > 0,05$) du taux sérique en AlkP, qui pourrait être due à une hyperactivité ostéoblastique (Figure 18). En effet, la phosphatase alcaline augmente en cas de minéralisation osseuse et d'ostéogénèse.

L'intoxication par le tetradifon entraîne une augmentation significative du contenu osseux en calcium et en phosphore (Tableau 6).

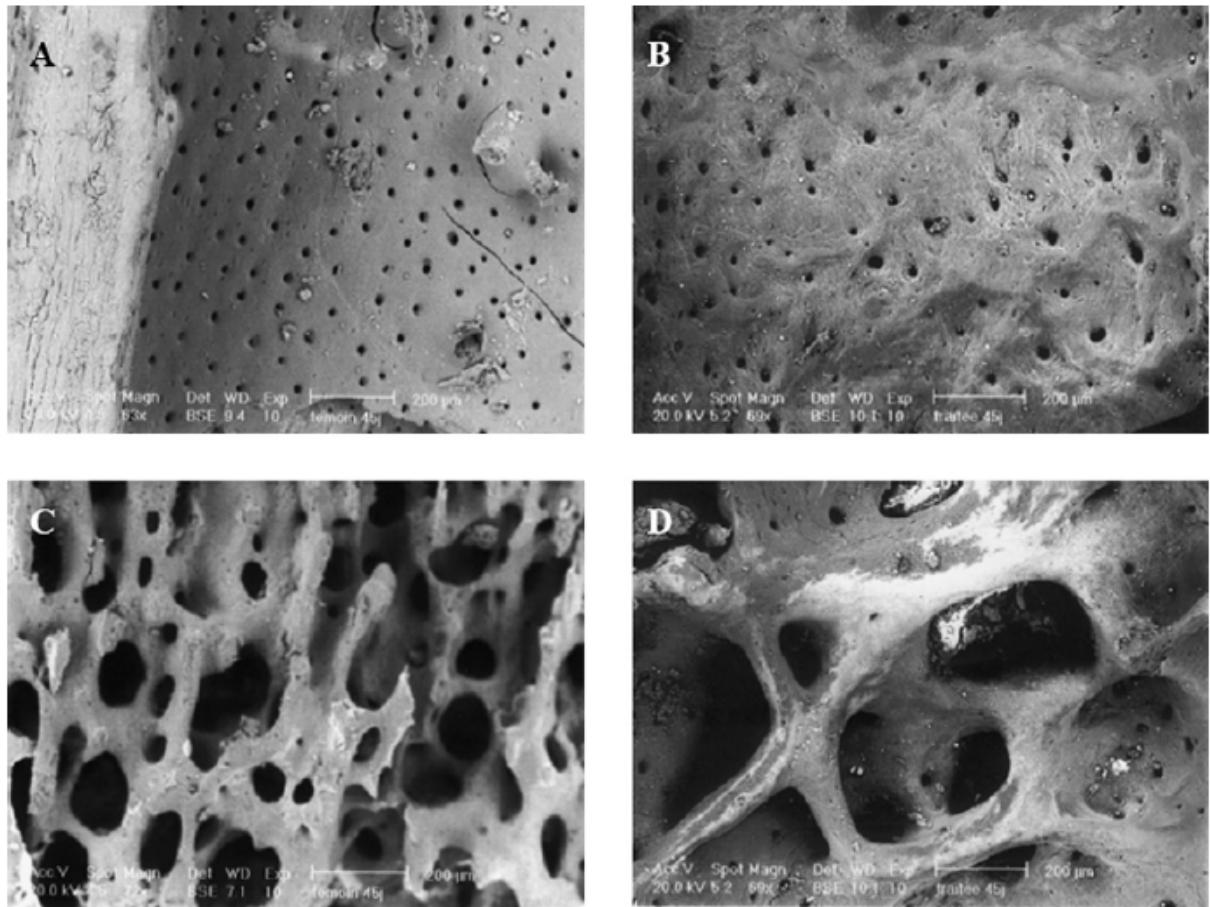


Figure 16 : Aspect de l'endoste (haut) et de l'os trabéculaire (bas) chez les rates témoins (gauche) et traitées au tetradifon (droite) pendant 6 et 12 semaines. Noter l'aspect différent de l'endoste ainsi que l'apparente augmentation de la distance intertrabéculaire.

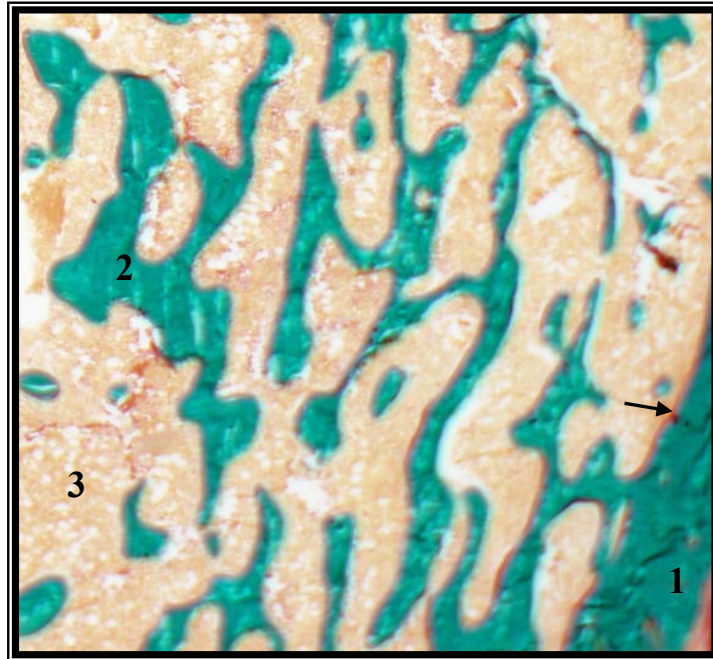


Figure 17 : Coupe histologique au niveau d'un fémur droit, sans préalable décalcification, colorée au trichrome de Goldner

- : Tissu ostéoïde
- 1 : Corticale osseuse
- 2 : Travée osseuse
- 3 : Moelle osseuse

Tableau 5 : Paramètres histomorphométriques mesurés au niveau de la spongieuse secondaire des fémurs inclus dans du méthyle méthacrylate sans préalable décalcification pour les différents groupes : Témoins et traitées au tetradifon.

	6 semaines		12 semaines	
	Témoins	Traitées	Témoins	Traitées
BV/TV (%)	32.17 ± 2.21	30.17 ± 2.02	32.83 ± 2.72	34.17 ± 2.07
OV/BV (%)	0.23 ± 0.02 ^d	0.31 ± 0.03	0.25 ± 0.03	0.41 ± 0.04 ^{ac}
OS/BS (%)	3.06 ± 0.25 ^d	4.53 ± 0.52	3.4 ± 0.34 ^d	5.4 ± 0.65 ^{ac}
GP.Th (µm)	61.9 ± 3.7	80.8 ± 9.2	63.7 ± 6.2	69.5 ± 5.0
Ct.Th (µm)	143 ± 9	151 ± 10	137 ± 11	144 ± 8
Tb.Sp (µm)	161 ± 12	181 ± 14	180 ± 10	206 ± 6
Oc.S/BS (%)	3.8 ± 0.3	4.7 ± 0.3	4.9 ± 0.6	4.9 ± 0.7
Tb.Th (µm)	40.5 ± 2.6 ^d	50.3 ± 5.8 ^d	55.1 ± 3.2 ^d	67.7 ± 4.2 ^{abc}

^a $p < 0.05$ versus Témoins 6 semaines

^b $p < 0.05$ versus Traitées 6 semaines

^c $p < 0.05$ versus Témoin 12 semaines

^d $p < 0.05$ versus Traitées 6 semaines

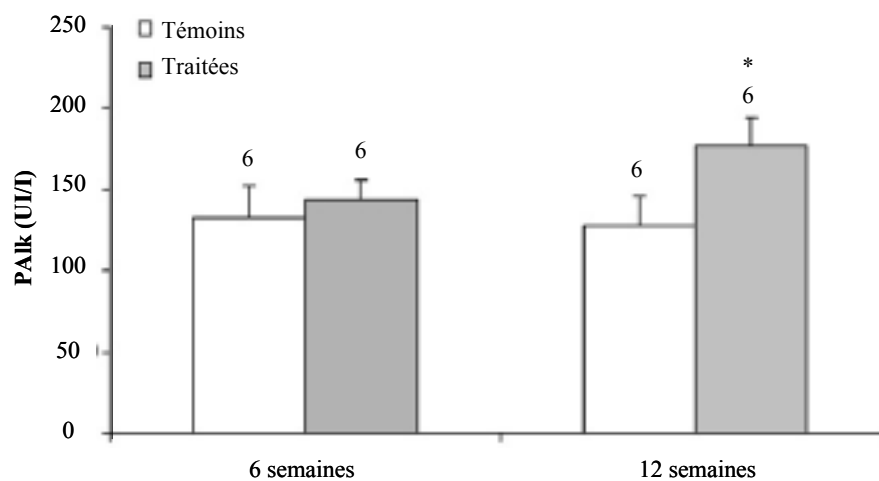


Figure 18 : Taux de la phosphatase alcaline (PALk, en UI/l) sérique chez les différents lots de rates : témoins et traitées au tetradifon pendant 6 et 12 semaines

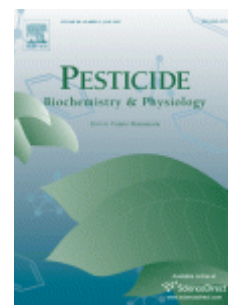
Tableau 6 : Teneurs sériques et osseux en calcium et en phosphore pour les différents groupes : témoins et traitées au tetradifon pendant 6 et 12 semaines.

	6 semaines		12 semaines	
	Témoins	Traitées	Témoins	Traitées
Teneurs osseux (mg/g)				
Calcium	95.83 ± 5.87	128.16 ± 8.38*	95.5 ± 4.11	117.08 ± 7.09
Phosphore	38.08 ± 2.09	49.26 ± 3.76*	45.83 ± 3.02	48.66 ± 3.70
Teneurs sériques (mg/l)				
Calcium	2.42 ± 0.05	2.26 ± 0.05	2.32 ± 0.04	2.44 ± 0.04
Phosphore	3.10 ± 0.32	2.42 ± 0.08	2.63 ± 0.01	3.21 ± 0.20

* p < 0.05 versus témoins 6 semaines

Article 2

APPRECIATION DE L'EFFET GENOTOXIQUE DU TETRADIFON PAR DES TESTS CYTOGENETIQUE : ROLE DU STRESS OXYDATIF



May antioxidant status depletion by Tetradifon induce secondary genotoxicity in female Wistar rat via oxidative stress?

R. Badraoui, Z. Sahnoun, N.B. Abdelmoula, A. Hakim, M. Fki, T. Rebai
Pestic. Biochem. Physiol. 88:149-155(2007)

Nous avons choisi la même dose que précédemment avec les mêmes durées d'exposition pour évaluer l'effet génotoxique du tetradifon qui est largement controversé dans la littérature. Nous avons prélevé de la moelle osseuse pour des tests cytogénétiques. Nous avons utilisé le test d'aberration chromosomique (CAs) et/ou de remaniements chromosomiques par l'étude du caryotype en coloration standard et des échanges survenus entre les chromatides sœurs (SCEs) par la technique cytogénétique, d'incorporation du BrdU au cours du cycle cellulaire, décrites dans le matériel et méthodes.

Aucun signe de toxicité n'est enregistré jusqu'à la fin de l'expérience. Le pourcentage de CAs chez les témoins était de 2,71%. Après 6 semaines d'exposition au tetradifon, CAs a augmenté jusqu'à 3,22% et a continué à augmenter pour atteindre 4,14% après 12 semaines (Tableau 7).

Concernant les échanges survenus entre les chromatides sœurs (SCEs), nos résultats ont montré des légères variations. Ces variations sont plus accentuées au terme de 12 semaines. Cependant, les augmentations enregistrées ne sont pas significatives (Figure 19).

Notre appréciation de l'effet oxydant du tetradifon dans les tissus prélevés pour les rates témoins et traitées au tetradifon figure dans la figure 20. Nos résultats montrent que le foie, le rein et l'ovaire sont le siège d'une augmentation des TBARS dès les 6 premières semaines du traitement. Le tetradifon semble donc engendrer une lipopéroxydation au niveau des organes étudiés. En effet, les augmentations notées ont été de l'ordre de 2 à 3 fois le niveau observé pour les rates témoins. Concernant le poumon, la teneur des TBARS chez les rates traitées pendant 6 semaines est plus élevée mais la différence ne devient significative par rapport au lot témoin qu'au terme de 12 semaines de traitement (Figure 20).

Les teneurs sérique en vitamine A et E, pour les différentes rates témoins et traitées, ont été déterminé en utilisant la technique de Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) pour effectuer un dosage concernant. Les taux du statut oxydant total (TAS) ont été également déterminés.

Dans ce travail, les légères augmentations de CAs et SCEs au cours d'exposition au tetradifon ont été accompagnées d'une perturbation de la balance oxydative-antioxydative. En effet, parallèlement aux augmentations hautement significatives des taux du TBARS

tissulaires, des déplétions du statut antioxydant total (TAS), de vitamines A et E (VA et VE) et du rapport VE/triglycéride (VE/TG) ont été notés (Tableau 8).

Tableau 7 : Type et pourcentage d'aberrations chromosomiques (CAs) enregistrées chez les rates témoins et traitées au tetradifon pendant 6 et 12 semaines

Groupes et périodes de traitement	Nombre de mitoses examinées	Nombre de mitoses aberrantes	Type d'aberrations				Pourcentage de mitoses aberrantes (%)
			Cassure chromatinienne	Chromosome dérivatif	Marker chromosome	Minutes	
6 semaines							
Témoins (n = 6)	148	5	2	1	2	–	2.71
Traitées (n = 6)	186	6	3	–	2	1/–	3.22
12 semaines							
Témoins (n = 6)	189	7	2	1	1	2/1	3.7
Traitées (n = 7)	217	9	1	–	4	3/1	4.14

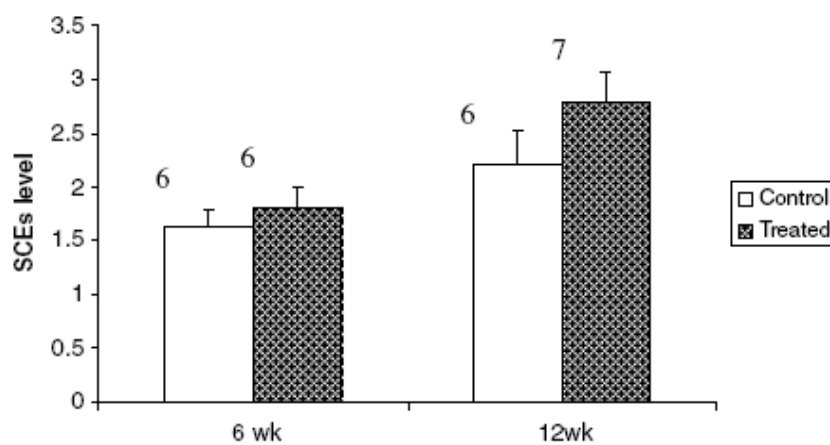


Figure 19 : Taux des échanges survenus entre les chromatides sœurs (SCEs) dans les cellules de la moelle osseuse des rates femelles témoins et traitées au tetradifon durant 6 et 12 semaines à une dose cumulative de 2430 mg/kg PC

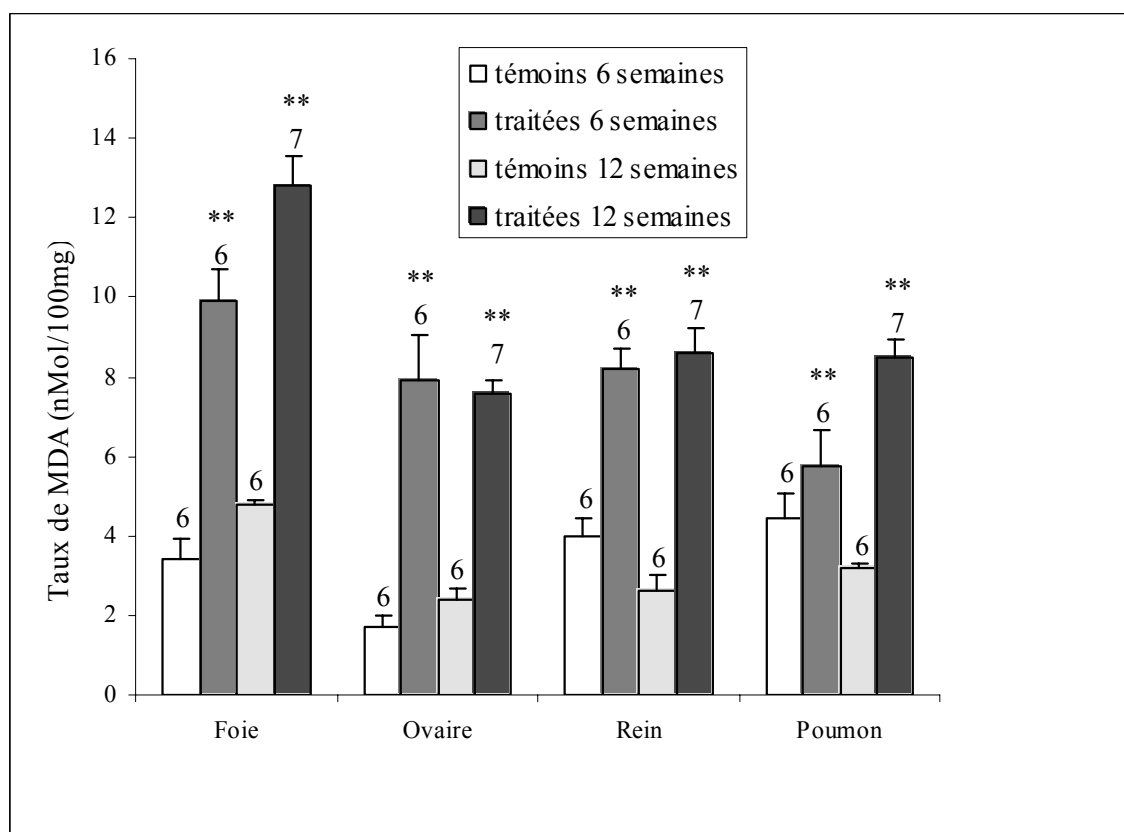


Figure 20 : Taux du TBARS dans le foie, l'ovaire, le rein et le poumon des rates témoins et traitées au tetradifon durant 6 et 12 semaines

Tableau 8 : Evolution des paramètres antioxydants envisagés : vitamine A et E (VA et VE), du rapport VE/triglycérides, et du statut antioxydant total (TAS) mesurés dans les sérums des rates témoins et traitées au tetradifon pendant 6 et 12 semaines.

	6 semaines	12 semaines
VA (mg/l)		
Témoins (n = 6)	0.286 ± 0.091	0.101 ± 0.007
Traitées (n = 6)	0.155 ± 0.014	0.135 ± 0.002 **
VE (mg/l)		
Témoins (n = 6)	4.733 ± 1.272	3.033 ± 0.202
Traitées (n = 6)	3.066 ± 0.397	2.9 ± 0.194
VE/TG		
Témoins (n = 6)	2.874 ± 1.011	4.767 ± 1.0
Traitées (n = 6)	1.757 ± 0.155	2.209 ± 0.14 *
TAS (mmol/l)		
Témoins (n = 6)	1.48 ± 0.14	1.43 ± 0.17
Traitées (n = 6)	1.36 ± 0.236	1.09 ± 0.122 *

* $p < 0.05$ versus Témoins

** $p < 0.01$ versus Témoins

Article 3

**EFFET IN VITRO DE L'ALPHA TOCOPHEROL ACETATE SUR
DES CELLULES WALKER 256 OSTEOPHILES ET
GENERATRICES DE METASTASES OSTEOLYTIQUES**



ATA reduces ROS releasing and induces apoptosis by DNA fragmentation in Walker 256 mammary gland carcinoma cells.

R. Badraoui, M.F. Moreau, T. Rebai, Z. Sahnoun, Y. Gallois, D. Chappard
Soumis pour publication : Clinica Chimica Acta, 2008

Dans ce travail, nous avons émis l'hypothèse qu'un traitement par un antioxydant (l'alpha tocophérol acétate (ATA)) pourrait avoir un effet sur la survie des cellules cancéreuses cultivées *in vitro*. Nous avons testé cette hypothèse sur des cellules Walker 256/B (lignée Suisse de l'adénocarcinome de la glande mammaire). Ces cellules Walker 256 sont réputées ostéophiles et génératrices de métastases osseuses ostéolytiques.

Un comptage cellulaire sur cytogramme, avec un test d'exclusion au bleu de trypan, a été réalisé afin de déterminer le nombre de cellules vivantes. A J0, le taux de mortalité été de 1%. Les cellules, Walker 256, ont été cultivées dans des boîtes de cultures a 24 puits. La figure 22 montre l'aspect des cellules walker 256/B en culture.

Vingt – quatre heures après stabilisation, le pourcentage d'apoptose et le dégagement de radicaux libres oxygénés (RLO) ont été quantifiés, par analyse d'image et mesure de fluorescence respectivement, après différentes périodes d'incubation avec l'alpha tocophérol acétate (24 ; 48 ; et 72 h).

La mise en évidence de l'apoptose a été réalisée par coloration au Hoeschst 33342. Cette technique nous a montré la présence de cellules en apoptose présentent une chromatine condensée donc un noyau très fluorescent. Des corps apoptotiques témoignent de la fragmentation de cette chromatine en structures globulaires séparées ou excroissances périphérique du noyau (Figure 23). Un effet dose-dépendant très marqué sur l'apoptose des cellules Walker 256 cultivées *in vitro* a été noté (Figure 24).

La production de radicaux libres oxygénés (RLO) a été évalué par un test à la 2,7 dichloro-dihydrofluorescine diacétate (DCFH-DA) à l'aide d'un spectrofluorimètre (TECAN). Nos résultats montrent que le traitement à l'ATA permet de réduire l'émission de ROS. Un effet dose-dépendant très marqué sur l'émission de ROS par les cellules Walker 256 cultivées *in vitro* a été noté (Figure 25).

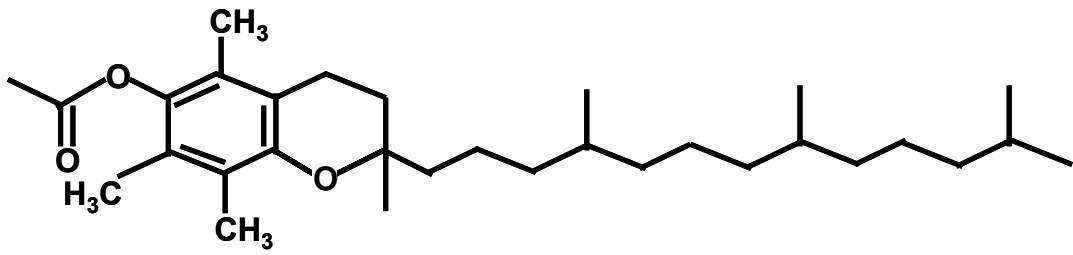


Figure 21 : Structure chimique de l'alpha tocophérol acétate

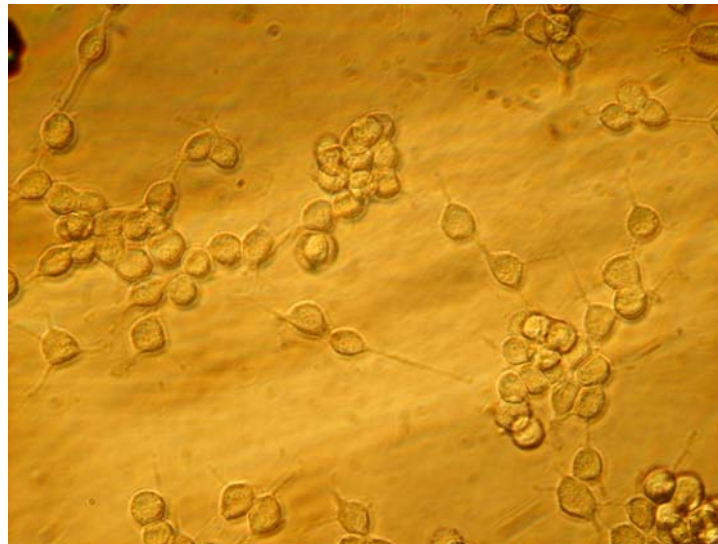
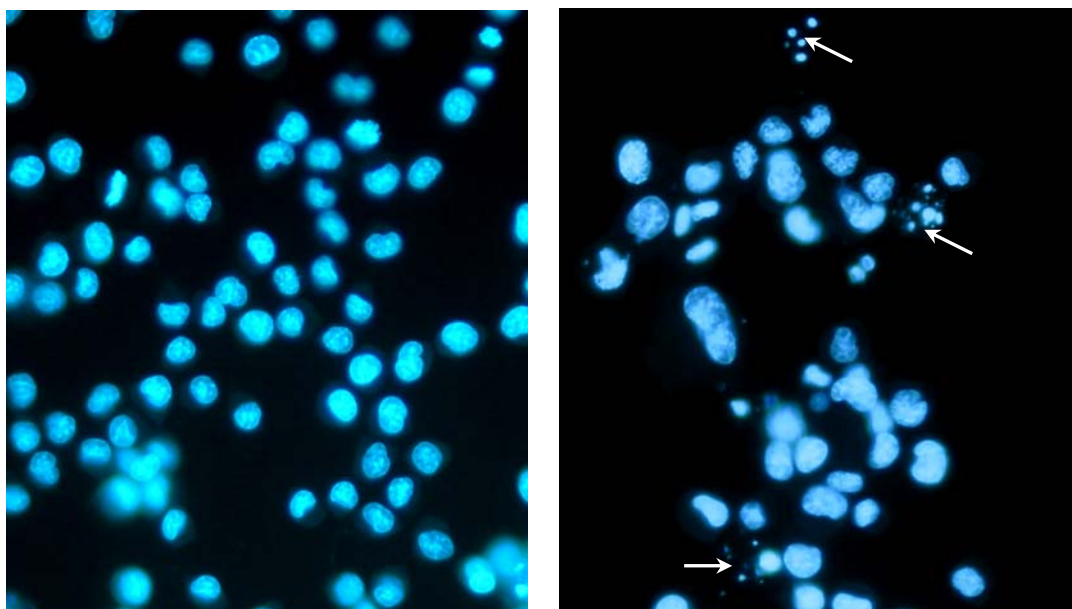


Figure 22 : Photographie des cellules Walker 256/B cultivées in vitro



*Figure 23 : Image des cellules Walker 256 montrant des fragmentations nucléaires.
Les flèches indiquent des corps apoptotiques.*

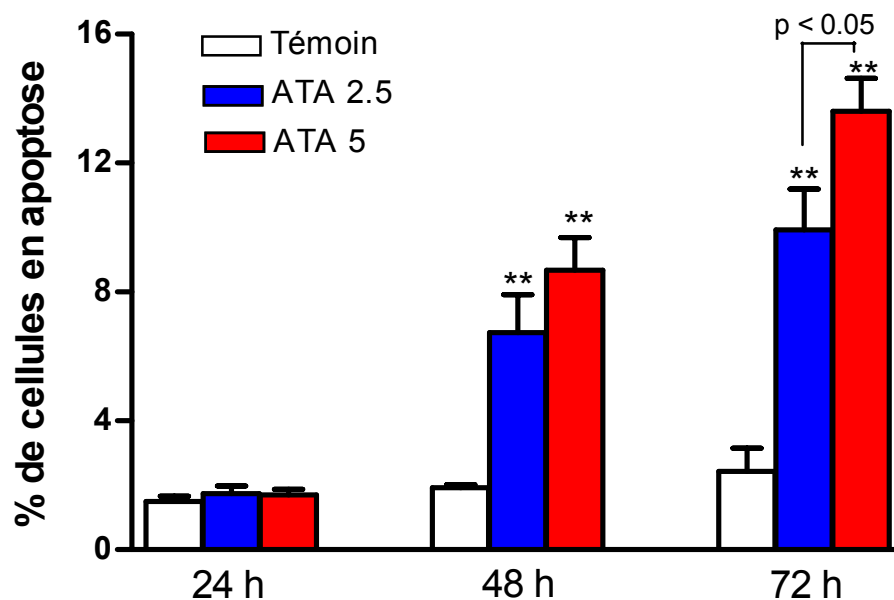


Figure 24 : Pourcentage de cellules montrant des corps apoptotiques pour les doses 0 ; 2,5 et 5 $\mu\text{g/ml}$ d'alpha tocoférol acétate (Témoin, ATA 2.5 et ATA 5 respectivement après 24, 48 et 72 heures du traitement. ** $p < 0.01$ versus Témoin

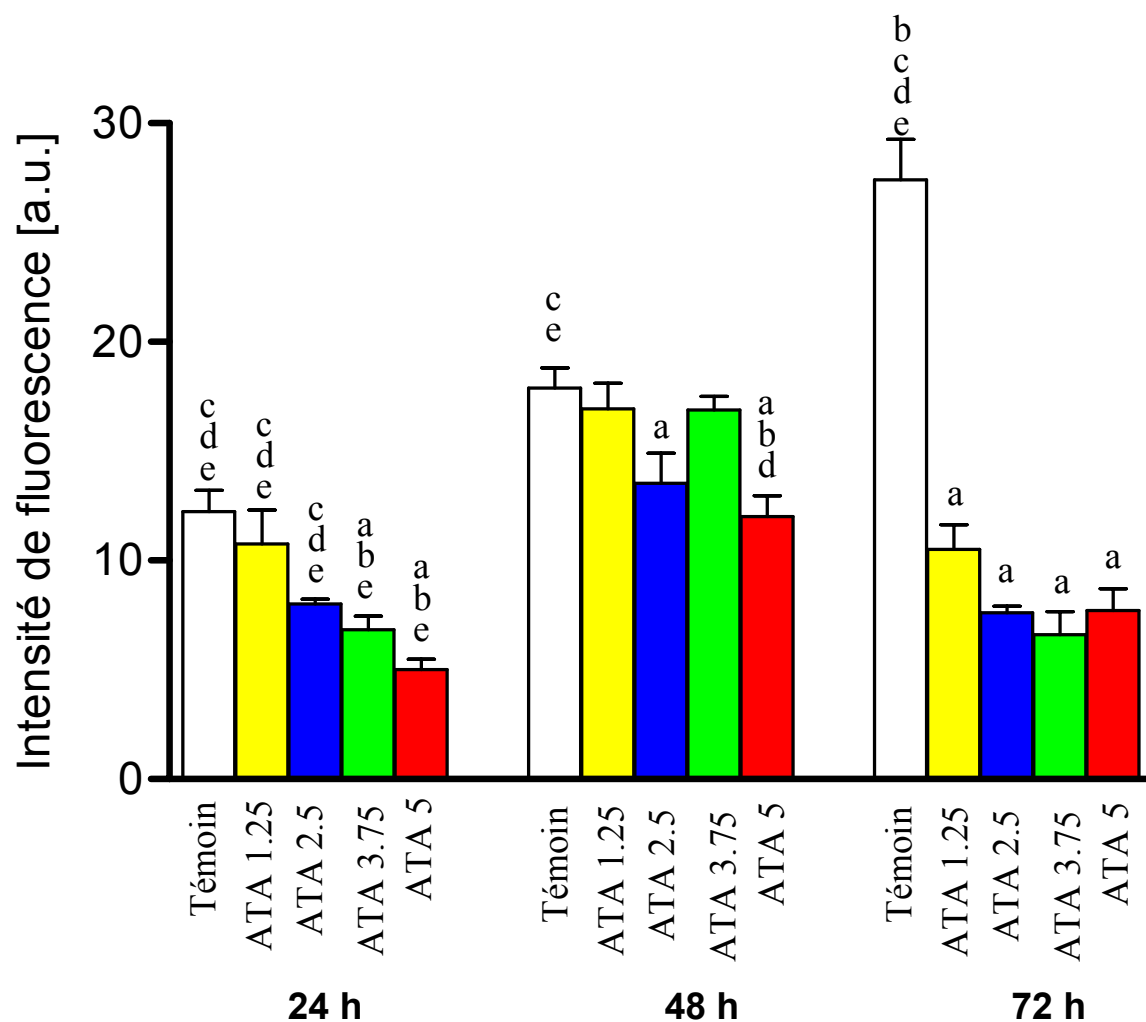


Figure 25 : Intensité de fluorescence détectée par le DCFH-DA chez des cellules Walker 256/B pour les doses 0 ; 1,25 ; 2,5 ; 3,75 et 5 $\mu\text{g/ml}$ d'alpha tocophérol acétate (ATA) après 24, 48 et 72 heures du traitement

- ^a $p < 0.05$ versus Témoin
^b $p < 0.05$ versus ATA 1.25
^c $p < 0.05$ versus ATA 2.5
^d $p < 0.05$ versus ATA 3.75
^e $p < 0.05$ versus ATA 5

Article 4

EFFET DE L'ALPHA TOCOPHEROL ACETATE SUR DES CELLULES WALKER 256/B INDUISANT DES DOMMAGES OXIDATIFS CHEZ UN MODELE DE METASTASES OSSEUSES OSTEOLYTIQUES



Effect of alpha tocopherol acetate on Walker 256 cells-induced oxidative damage in rat model of breast cancer skeletal metastases

R. Badraoui, S. Blouin, Z. T. Rebai, Z. Sahnoun, M.F. Baslé, D. Chappard
Soumis après révision : Cancer Biol Ther, 2008



A rat model of breast cancer skeletal metastases

R. Badraoui, N.B. Abdelmoula, D. Chappard, T. Rebai
Biol. Tun. 5 :109-110(2008)

Comme nous avons pu le montrer dans l'article N°3, la vitalité des cellules W256 est affectée par le traitement à l'ATA. Dès lors, nous avons regardé l'effet de cet antioxydant, *in vivo*, sur le statut oxydant/antioxydant dans le microenvironnement osseux et sur l'évolution de la microarchitecture osseuse d'un modèle murin de métastases osseuses ostéolytiques.

Des cellules tumorales Walker 256, préalablement cultivées *in vivo*, puis passées deux fois de suite dans la cavité péritonéale d'un rat pour un développement en ascite après injection intrapéritonéale sont nécessaires. Nous avons tout d'abord étudié l'effet de l'injection *in situ* des cellules Walker 256 chez le rat male Sprague Dawley (SD) afin de caractériser le modèle expérimental de métastases osseuses ostéolytiques. Nous avons ensuite vérifié notre hypothèse en traitant par gavage ce modèle murin à l'ATA à raison de 45mg/kg PC.

La lignée Walker 256 a été utilisée en injection intraosseuse. Après avoir incisé la cuisse de l'animal, un trou est effectué à l'aide d'une turbine de dentiste. Le trou est immédiatement rebouché avec de la cire de Horsley. Les cellules ont été injectées à travers la cire à l'aide d'une seringue équipée d'une aiguille courbée (Figure 10). 20 jours après injection intraosseuse des cellules W256, issues de la deuxième ascite, les rats ont été euthanasiés. L'évolution de la microarchitecture osseuse a été évaluée par 3 méthodes :

- **Radiographie** : pour apprécier l'ostéolyse tumorale induit par les cellules Walker 256.
- **Microtomographie à rayons X (microCT)** : pour évaluer le volume trabéculaire 3D au stade terminale de l'affectation. La reconstruction 3D du volume de référence (sélectionnée par un algorithme basé sur l'interpolation de polygones sur les images 2D) aboutit à un modèle constitué uniquement du réseau trabéculaire dans un espace spongieux. Le volume est déterminé automatiquement par le logiciel de reconstruction 3D (ANT).
- **Histologie** : pour analyser la microarchitecture osseuses ainsi que pour dénombrer les cellules résorbantes de l'os (ostéoclastes) selon une technique récemment publiée (Grizon, *et coll.*, 2002).

Les lésions osseuses induites se présentent comme une importante ostéolyse de la zone spongieuse primaire formant une bande radiotransparente sous le cartilage de croissance visible en radiographie (Figure 26), en histologie (Figure 27), et en microCT (Figures 27 et 30). Nous avons noté également une disparition trabéculaire quasi-totale avec une importante effraction corticale.

Dans notre étude, nous avons montré que 20 jours après inoculation intra osseuse étaient suffisants pour induire des pertes osseuses avec perturbation du statut oxydant du microenvironnement osseux (sérum, moelle et tissus osseux). En effet, le stress oxydatif dans le microenvironnement osseux avec métastases osseuses ostéolytique a été évalué par la détermination du TBARS et du CC. Ces mesures présentent le niveau de peroxydation lipidique et d'oxydation protéique respectivement. Le statut antioxydant a été évalué par la détermination des taux de superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), et de glutathion peroxydase (GSH-p).

Le groupe témoin présente les plus faibles taux de TBARS (Figure 31) et CC (Figure 32). Il est suivi par le groupe W256+ATA. L'inoculation des cellules tumorales augmente considérablement ces 2 paramètres. Cependant, il faut remarquer que le traitement à l'ATA paraît réduire significativement l'état de stress oxydatif dans le microenvironnement osseux, et préserve légèrement l'architecture du cartilage. Le groupe W256+ATA a montré une réduction de la masse tumorale par la présence de grosses plages de nécrose cellulaire (Figure 28). Cependant, nous avons noté chez le groupe cancéreux et traité par l'ATA, la présence de tissus ostéoïde ('woven bone') apposé sur l'endoste ainsi que sur les anciennes travées osseuses (Figures 27 et 28). Ces paquets d'os métaplasique néoformé pourraient être dues au pouvoir stimulant ostéosclérotique de l'ATA. Elles envahissent les tissus mous au voisinage des cellules tumorales.

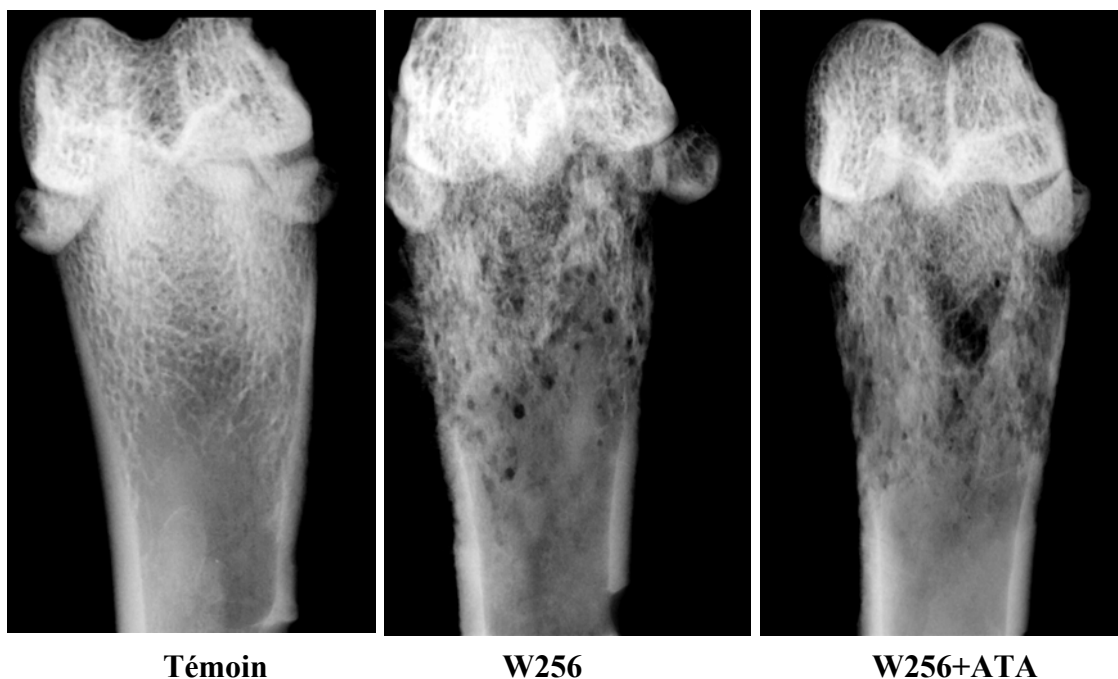


Figure 26 : Radiographie des fémurs droits de rat témoin, injecté en intraosseux avec 10^6 cellules Walker 256 (W256), et injecté en intraosseux avec 10^6 cellules Walker 256 et traité à l'ATA à raison de 45 mg/kg PC (W256+ATA). Noter les pertes osseuses trabéculaires et l'effraction corticale chez les rats métastasés.

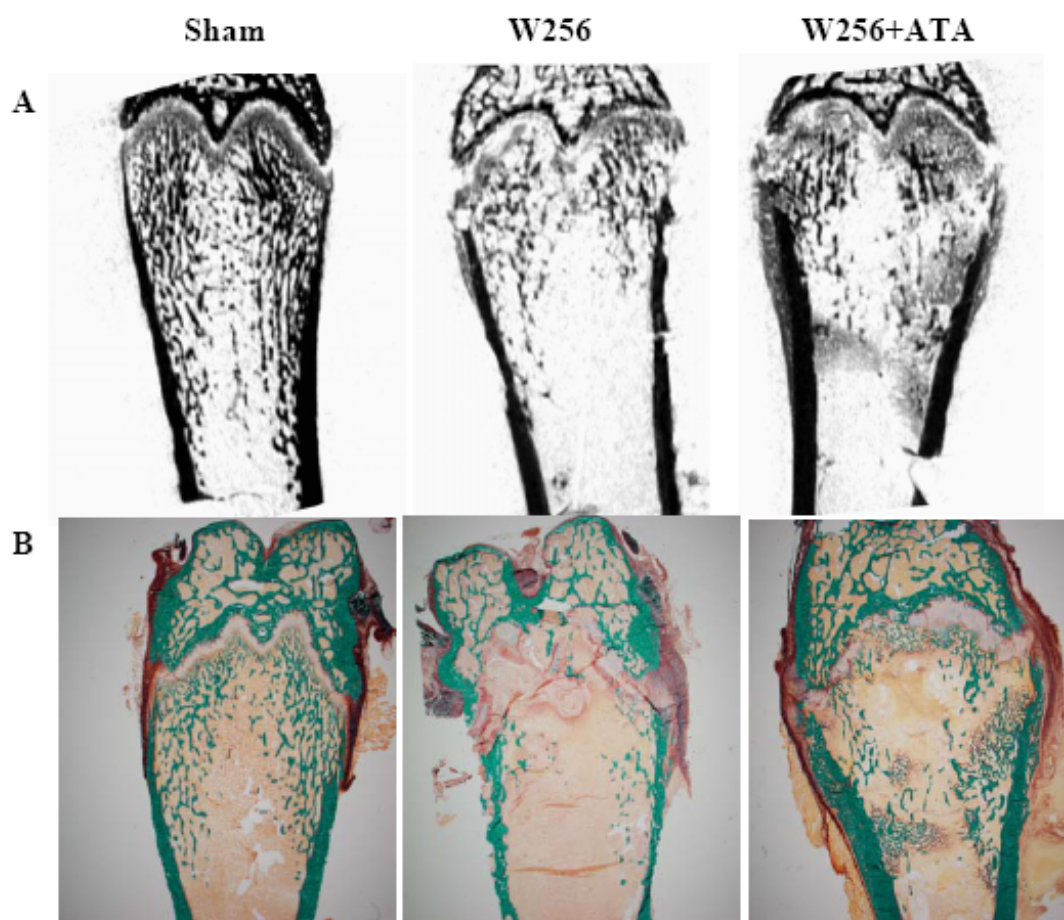


Figure 27 : Coupes 2D obtenus par microCT (A) et histologie (B) des fémurs de rat témoin et de rat métastasé 20 j après injection in situ de cellules Walker 256. On remarque une ostéolyse quasi-totale des travées ainsi qu'une importante effraction corticale chez W256 group. Noter la nette prolifération d'os métaplasique (woven bone), aspect trompant qui paraît comme un bruit du fond en coupes 2D sous rayons X du microscanner, chez le groupe W256+ATA avec légère préservation du cartilage.

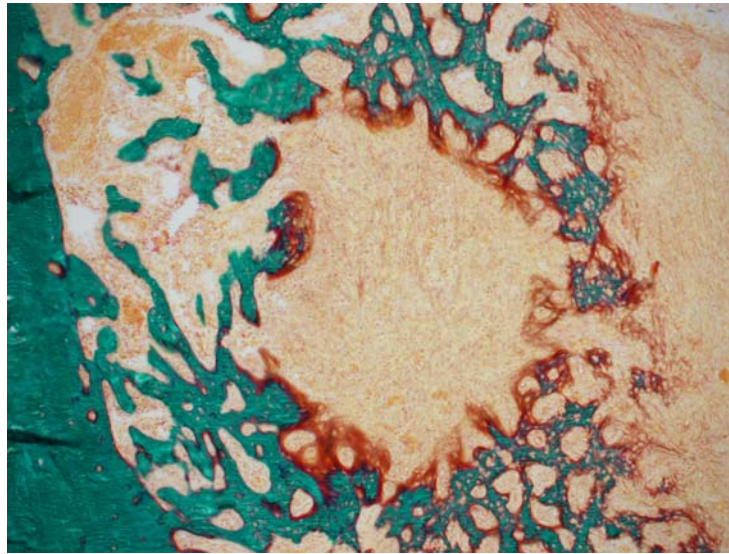


Figure 28 : Coupe histologique du fémur distal d'un rat métastasé et traité à l'ATA. Noter l'apposition d'os métaplasique au voisinage des foyers tumoraux.

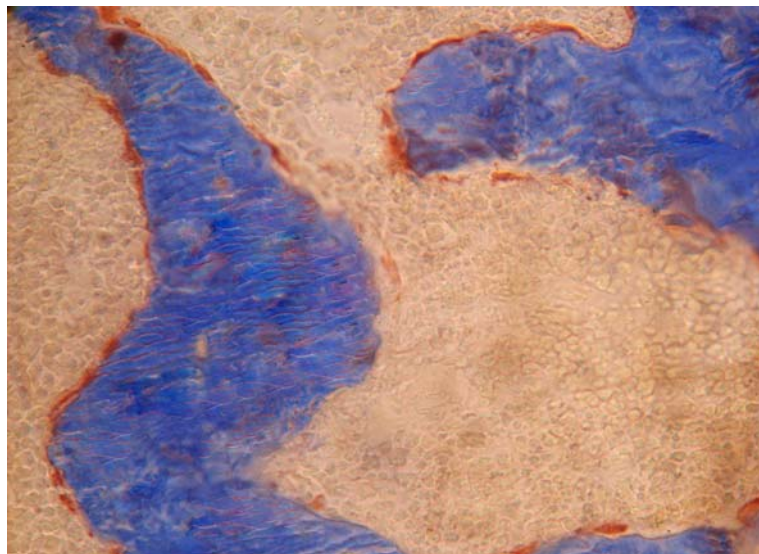


Figure 29 : Ostéoclastes multinucléés TRAcP+ apposés sur les travées osseuses. Les ostéoclastes apparaissent avec une coloration rouge brique contenant des noyaux pâles.

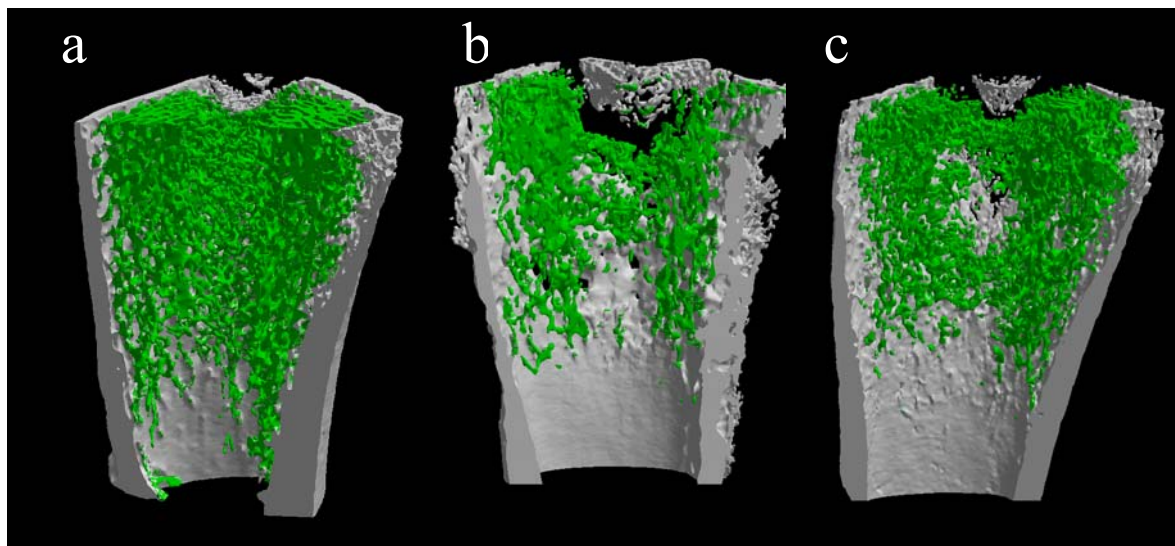


Figure 30 : Modèles 3D obtenus par microCT des fémurs d'un rat témoin (a), rat injecté en intra osseux par des cellules Walker 256 (b), d'un rat du groupe W256+ATA (c).

Tableau 9 : Paramètres hitomorphométriques obtenus par microCT

	Sham	W256	W256+ATA
BV/TV (%)	11.26 ± 1.6	2.33 ± 0.47 ^{a,c}	8.67 ± 1.45 ^b
Tb.P _f	3.6 ± 1.6	14.2 ± 1.0 ^{a,c}	6.2 ± 1.4 ^b
Tb.Th (μm)	136 ± 8	119 ± 4 ^a	150 ± 7 ^b
Tb.N (/mm)	0.80 ± 0.08	0.19 ± 0.03 ^{a,c}	0.56 ± 0.08 ^{a,b}
Tb.Sp (μm)	1272 ± 55	1725 ± 70 ^{a,c}	1440 ± 95 ^{a,b}

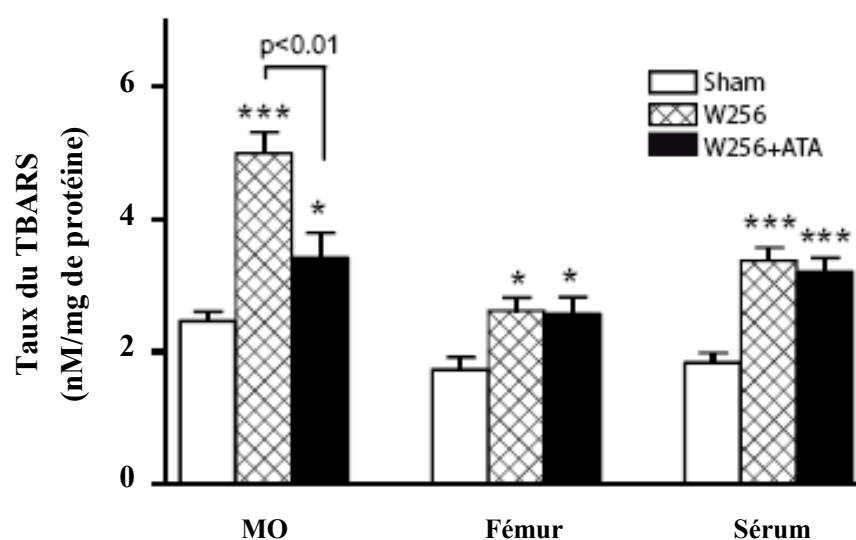


Figure 31 : Taux de la peroxydation lipidique (TBARS) dans la moelle osseuse (MO), les fémurs opérés, et dans le sérum chez les rats témoins opérés (Sham), W256 et W256+ATA.

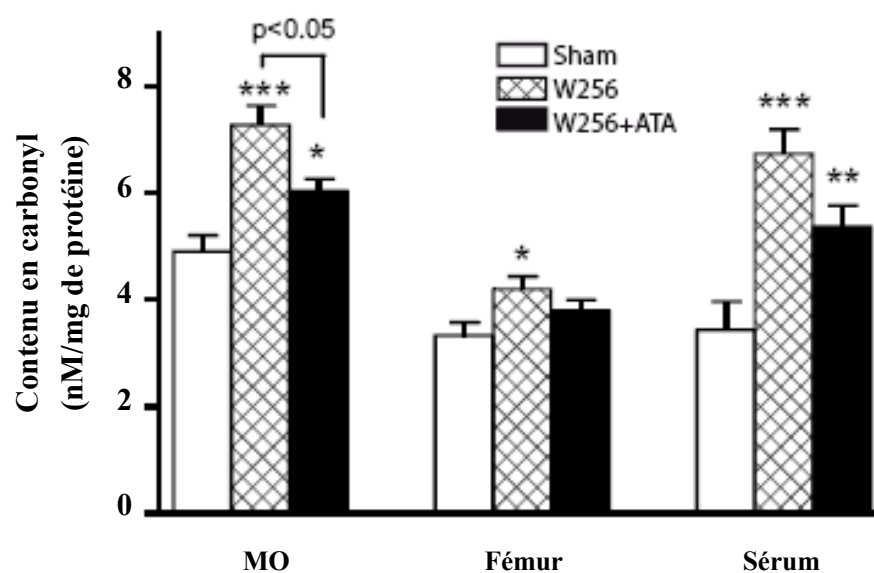


Figure 32 : Taux d'oxydation protéique (contenus en carbonyles) dans la moelle osseuse (MO), les fémurs opérés, et dans le sérum chez les rats témoins opérés (Sham), W256 et W256+ATA.

Tableau 10 : Activités enzymatiques antioxydantes du superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), et du glutathion peroxydase (GSH-p), dans les sérums, les fémurs opérés, et dans la moelle osseuse des rats Sham, W256, et W256 + ATA.

	Sham	W256	W256 + ATA
SOD (U/mg)			
Sérum	26.4 ± 1.2	33.3 ± 1.8 ^a	29.7 ± 1.4
Fémur opéré	17.9 ± 1.7	10.2 ± 0.9 ^a	14.1 ± 2.1
Moelle osseuse	10.3 ± 0.9	5.9 ± 0.7 ^a	8.1 ± 0.0
Catalase (U/g)			
Sérum	2.3 ± 0.2	1.5 ± 0.2	1.7 ± 0.3
Fémur opéré	7.9 ± 1.4	8.9 ± 1.6	8.9 ± 1.5
Moelle osseuse	4.1 ± 0.3	4.1 ± 0.4	4.2 ± 0.5
GSH-p (U/mg)			
Sérum	27.3 ± 1.1	33.3 ± 1.8	30.8 ± 2.1
Fémur opéré	17.9 ± 1.1	10.8 ± 0.9 ^{a,c}	15.2 ± 0.7 ^b
Moelle osseuse	27.5 ± 1.3	21.9 ± 0.7 ^a	24.9 ± 1.7

Article 5

BILAN HEPATO-RENAL DANS LE MODELE ANIMAL DE METASTASES OSSEUSES INDUIT PAR INOCULATION *IN SITU* DES CELLULES WALKER 256/B



Lack of renal and hepatic lesions in experimental model of
advanced bone metastasis due to Walker 256 cells

R. Badraoui, S. Blouin, D. Chappard, T. Rebai
Soumis pour publication : Pathol. Oncol. Res. 2008

Il existe de nombreux modèles animaux avec perte osseuse pour simuler les métastases ostéolytiques humaines. Ils nécessitent souvent une injection de cellules cancéreuses, ostéophiles et métastatiques. Certains modèles, par injection intra cardiaque ou intra veineuses, induisent des métastases osseuses souvent accompagnées de métastases hépatiques, rénales et/ou pulmonaires (Blouin, *et coll.*, 2006). Le rein et le foie sont particulièrement sensibles à l'action des substances environnementales et ceci en raison de leurs intenses activités métaboliques et épuratives ainsi que leurs multiples fonctions. De plus, le rein constitue l'organe le plus important du contrôle de l'homéostasie du milieu intérieur et notamment pour le calcium.

Dans ce cadre nous nous sommes intéressés à évaluer les effets secondaires des métastases osseuses sur la fonction rénale et hépatique dans le modèle expérimental de métastases osseuses utilisé dans cette thèse, et ceci à travers des analyses histologiques et biochimiques sur des échantillons biologiques d'organes (rein et foie), de sang et urine. Les taux sériques de créatinine, protéine totale ont été déterminés. Nous avons utilisé des kits Elitech (France) pour dosage d'aspartate transaminases (ASSL-0400), alanine transaminases (ALST-0400), cholestérol (CHSL 4900), et triglycéride (TGML 0425). La teneur de phosphatase alcaline (ALP, EC 3.1.3.1) a été également mesurée dans le sérum de chaque rat. Des coupes histologiques des échantillons de rein gauche et du foie ont été réalisées. Les coupes obtenues ont été colorées à l'hématoxyline – éosine (HE) et à l'acide périodique de Schiff (PAS).

L'étude de la fonction rénale des rats inoculés par les cellules Walker 256 a montré que les métastases osseuses induites par injection in situ des cellules Walker 256 n'ont pas entraîné une augmentation de la créatinémie ce qui témoigne de l'absence d'atteinte rénale ou de filtration glomérulaire.

L'analyse 3D a montré des pertes osseuses trabéculaires et corticales (Figure 33). Cela pourrait expliquer les résultats figurant dans la figure 34, notamment l'hypercalcémie. L'examen histologique a montré l'absence d'infiltration de cellules tumorales dans les parenchymes rénales et hépatiques. Aucune pathologie n'a été détectée sur le plan histologique (Figure 35). Cependant, l'exploration biochimique a montré quelques différences significatives par rapport aux témoins opérés (Figure 36 et tableau 11).

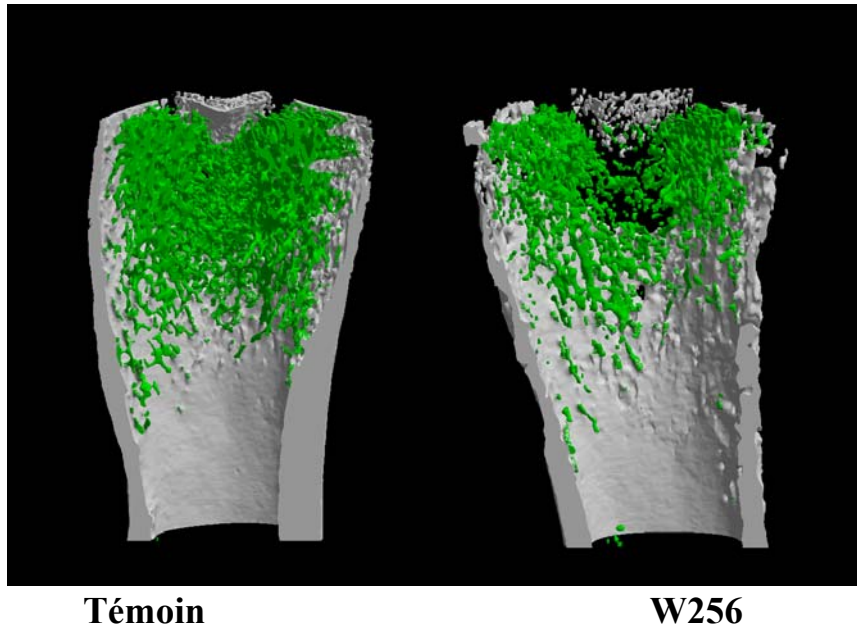


Figure 33: Modèles 3D d'os cortical et trabéculaire des fémurs d'un rat témoin et d'un rat métastaté par les cellules Walker 256/B (W256)

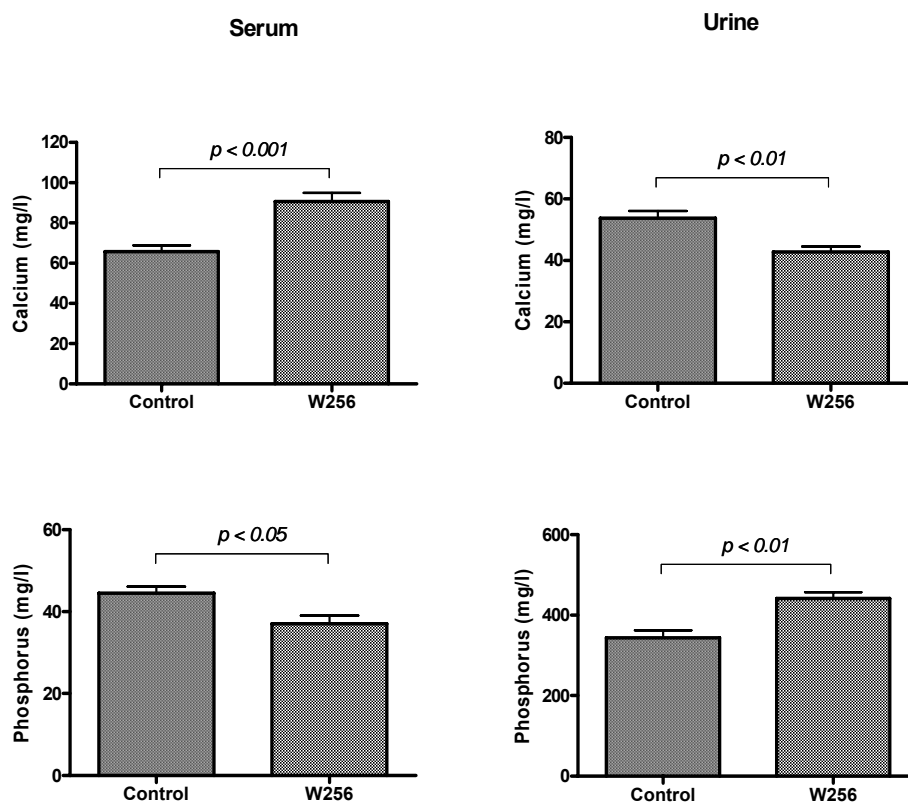


Figure 34 : Teneurs sérique et urinaire en calcium et en phosphore des rats témoins et des rats métastasés 20j après injection intraosseuse de cellules Walker 256

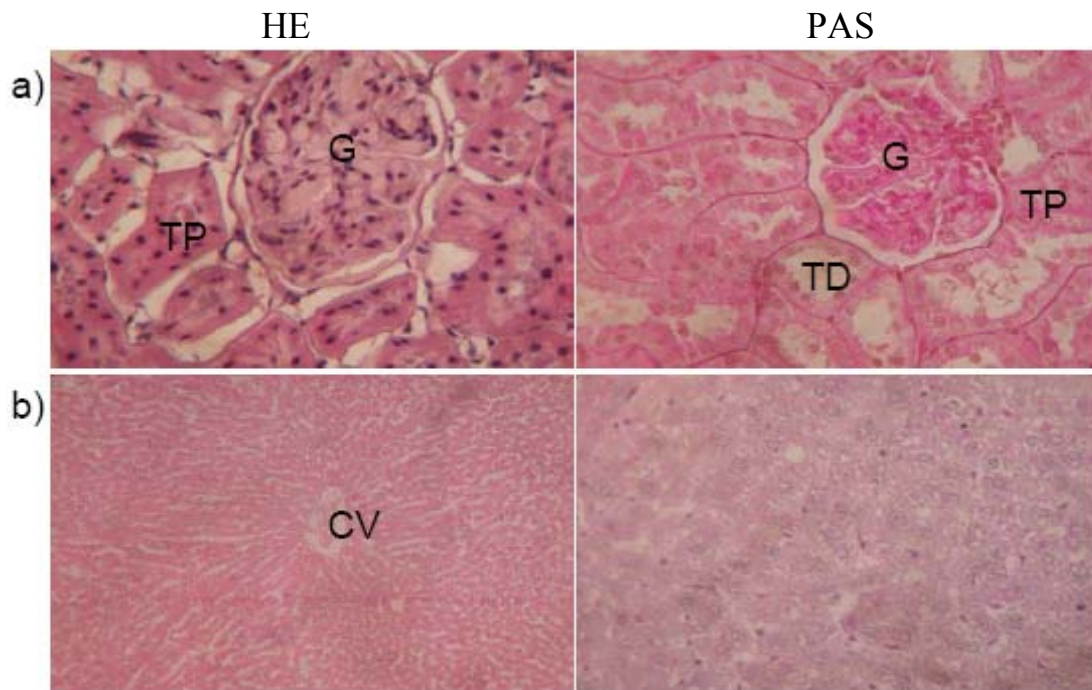


Figure 35 : Coupes histologiques de rein (a) et de foie (b) de rats 20 jours après injection intraosseuse de cellules Walker256. G : glomérule ; TP : tube proximal ; TD : tube distal ; CV : veine centrolobulaire.

Tableau 11 : Paramètres biochimiques envisagés chez les rats SD témoins opérés (Sham) et inoculés par les cellules Walker (W256) 20j après opération.

	Groupes		vs. Sham %	p
	Sham (n=6)	W256 (n=6)		
Cholestérol (mg/dL)	130.3 ± 7.9	97.38 ± 7.34	- 25.2	^a
Triglycéride (mg/dL)	74.83 ± 4.8	58.13 ± 5.39	- 22.3	^a
AST (U/L)	173.8 ± 7.81	176.8 ± 13.55	+ 1.7	NS
ALT (U/L)	27.67 ± 3.09	31.75 ± 3.81	+ 14.7	NS
ALP (U/L)	553.3 ± 22.48	440.9 ± 32.12	- 20.3	^a
Bilirubine (mg/dL)	0.42 ± 0.02	0.54 ± 0.04	+ 28.5	^a

^a $p < 0.05$ versus Témoins

NS : Non significative ($p > 0.05$)

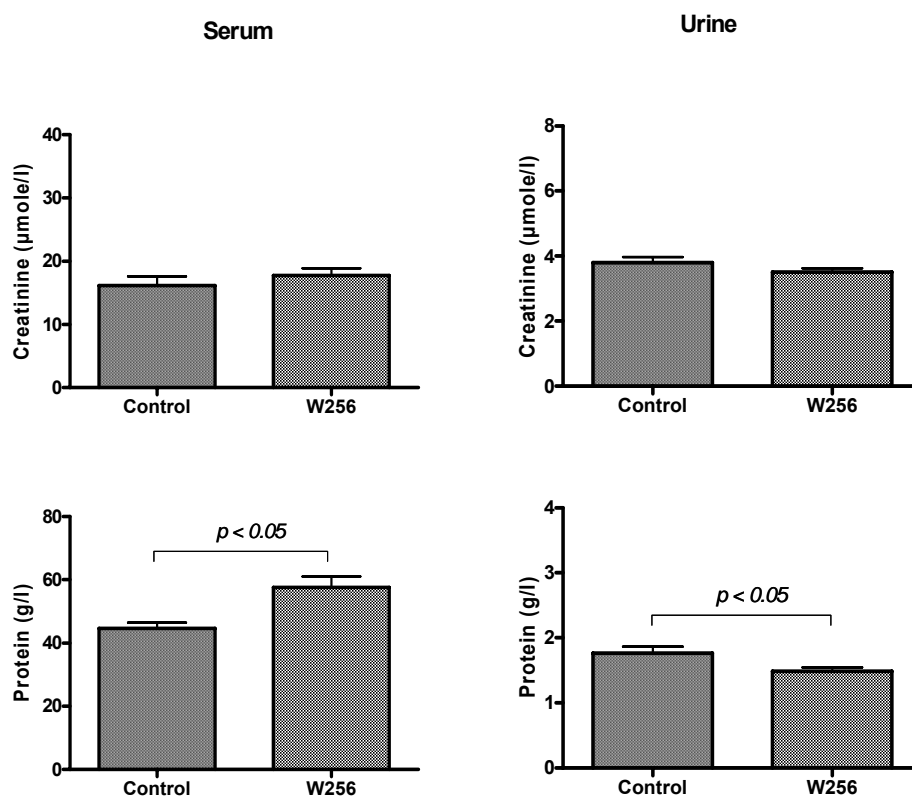


Figure 36 : Teneurs sérique et urinaire en créatinine et en protéine des rats témoins et des rats métastasés 20j après injection intraosseuse de cellules Walker 256.

Conclusions et perspectives

Le microenvironnement osseux est physiologiquement soumis à un réseau complexe d'interactions : cytokines, facteurs de croissance et hormones systémiques (vitamine D, oestrogènes, parathormone, calcitonine), où le système RANK/RANKL/OPG représente un facteur majeur de régulation des ostéoclastes. Ce microenvironnement est un site d'extension métastatique des tumeurs solides. De nombreuses complications liées à ces métastases peuvent engager le pronostic vital. Celles-ci sont essentiellement dues à un excès de résorption ostéoclastique au voisinage des cellules métastatiques (pour les cancers solides) et des cellules plasmocytaires malignes (pour le myélome). Cette ostéolyse est responsable, sur le plan clinique, de complications particulières telles que fractures, hypercalcémie et douleurs pouvant engager le pronostic vital ou détériorer rapidement la qualité de vie.

Au cours de ce travail nous nous sommes intéressés aux états du remodelage osseux suite à une intoxication subaiguë au tetradifon, pesticide organochloré à effet *estrogen-like* (SERMs), dans le but d'identifier son effet sur la matrice osseuse et contrôler ses pouvoirs génotoxiques direct et indirect via le stress oxydant. Nous nous sommes également intéressés à la modification de la microarchitecture osseuse au cours des métastases osseuses ostéolytiques induites par inoculation intra osseuse des cellules Walker 256 (adénocarcinome de la glande mammaire). L'effet de l'alpha tocophérol acétate (ATA), largement recommandée comme adjuvant, a été également abordée *in vivo* et *in vitro*.

SERMs-like : intoxication au tetradifon

Le premier travail, nous a permis d'étudier l'évolution de la microarchitecture et la composition minérale de l'os au cours d'intoxication à un pesticide ayant la possibilité de se fixer sur les récepteurs de l'œstrogène, donc un perturbateur endocrinien à effet SERM. Notre travail, a permis de caractériser les modifications de texture osseuse avec l'analyse histomorphométrique et MEB. En effet, nous avons noté des élévations au niveau de la surface et volume ostéoïde (OS/BS et OV/BV), l'épaisseur des trabécules (Tb.Th) ainsi que la distance intertrabéculaire (Tb.Sp). Nous avons également mis en évidence, une perturbation de la composition minérale de l'os au cours de la perturbation du remodelage. Or la composition minérale est un paramètre important régissant le maintien de l'homéostasie. On peut donc émettre l'hypothèse que le tetradifon, par son effet SERMs stimule l'activité ostéoblastique et influence la composition minérale de l'os par activation de la cristallisation des ions Ca et Ph.

Actuellement, il est admis que les pesticides organochlorés sont réputés fortement génotoxiques et promoteurs de tumeurs. Dans le deuxième chapitre, nous avons pu montrer une augmentation de teneurs de TBARS tissulaires (foie, ovaire, rein et poumon), avec une déplétion des antioxydants (VE, VA, VE/TG), et du TAS chez les animaux traités. Cependant l'analyse cytogénétique a montré que le tetradifon n'engendre pas de lésions chromosomiques (CAs et SCEs). Néanmoins des légères augmentations ont été notées. Cela nous a permis de penser que le tetradifon pourrait engendrer une génotoxicité secondaire via la déplétion du statut antioxydant et que l'augmentation du TBARS tissulaire pourrait être la cause et/ou la conséquence d'une déplétion vitaminique importante.

Métastases osseuses ostéolytiques

Les troisième et quatrième chapitres ont porté sur l'effet d'un antioxydant (l'alpha tocophérol acétate : ATA) sur des cellules tumorales de l'adénocarcinome de la glande mammaire Walker 256/B *in vitro* et *in vivo* chez un modèle animal de métastases osseuses.

Nous avons tout d'abord observé que l'ATA inhibe la prolifération des cellules Walker 256 endothéliales *in vitro* ainsi que l'émission des RLO. L'inhibition de production des RLO semble être liée au fait que les cellules Walker 256 entrent en apoptose suite au traitement par l'ATA. Ces résultats nous ont semblé satisfaisant. Nous avons dès lors développé un modèle animal des métastases osseuses ostéolytiques, dans lequel l'injection *in situ* des cellules Walker 256 entraînait des pertes osseuses trabéculaires. Ces pertes d'os trabéculaire étaient accompagnées d'une effraction corticale et d'une conversion de plaques en piliers. Ces pertes osseuses étaient partiellement compensées en administrant aux animaux cancéreux de l'ATA à raison de 45 mg/kg PC. Cependant, nous avons noté que cette compensation été suivi d'une prolifération d'os métaplasique (ostéosclérotique) qui envahit la cavité médullaire des fémurs inoculés par des cellules Walker 256. Par ailleurs, nous avons constaté que l'ATA réduit significativement l'installation d'un état de stress oxydant dans le microenvironnement osseux. Ces résultats viennent d'être récemment confirmés par une autre étude montrant que la vitamine E inhibe l'oxydation (Yamamoto, *et coll.*, 2007).

Dans le dernier travail de cette thèse, nous avons caractérisé, pour ce modèle animal des métastases osseuses, les activités rénale et hépatique par analyses histologiques et biochimiques. Nous n'avons pas noté d'infiltration de cellules tumorales au niveau de

deux parenchymes rénale et hépatique. De plus il paraît que ce modèle animal ne présente pas de pathologie jusqu'au vingtième jour (jour d'euthanasie). Ces résultats s'expliquent du fait que les métastases osseuses sont un phénomène local.

Perspectives

Il conviendra de mieux comprendre les synergies d'action éventuelles qui peuvent exister d'une part entre le xénoestrogènes et d'autres facteurs chimiques et physiques, d'autre part entre les bisphosphonates et les adjuvants couramment utilisés en clinique. Ces approches devraient permettre dans l'avenir de mieux définir la place des adjuvants dans l'arsenal thérapeutique utilisé en tumeurs osseuses et des parties molles.

L'apparition de symptômes osseux ou d'une fracture est généralement un évènement tardif dans l'évolution d'un cancer et la survie des patients atteints est dès lors limitée. Le modèle animal de métastases osseuses utilisé pourrait être envisagé pour évaluer l'efficacité de biomatériaux dans le traitement local de l'ostéolyse tumorale.

On peut également envisager d'étudier *in vitro* l'effet de l'ATA, couplé ou pas à un composé pharmacologique anti métastatique, sur l'apoptose ostéoclastique.

Références bibliographiques

- [1] M. Abe, K. Hiura, J. Wilde, *et coll.* Role for macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *Blood* 100: 2195-202; 2002.
- [2] A. Achbarou, S. Kaiser, G. Tremblay, *et coll.* Urokinase overproduction results in increased skeletal metastasis by prostate cancer cells in vivo. *Cancer Res* 54: 2372-7; 1994.
- [3] S. Adami, J. San Martin, M. Munoz-Torres, *et coll.* Effect of raloxifene after recombinant teriparatide [hPTH(1-34)] treatment in postmenopausal women with osteoporosis. *Osteoporos Int* 19: 87-94; 2008.
- [4] G. Addolorato, L. Leggio, V. Ojetti, *et coll.* Effects of short-term moderate alcohol administration on oxidative stress and nutritional status in healthy males. *Appetite* 50: 50-6; 2008.
- [5] V. Afonso, R. Champy, D. Mitrovic, *et coll.* Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Rev Rhum* 74: 636-43; 2007.
- [6] M. Alsina, T. A. Guise and G. D. Roodman. Cytokine regulation of bone cell differentiation. *Vitam Horm* 52: 63-98; 1996.
- [7] A. K. Alveblom, L. Rylander, O. Johnell, *et coll.* Incidence of hospitalized osteoporotic fractures in cohorts with high dietary intake of persistent organochlorine compounds. *Int Arch Occup Environ Health* 76: 246-8; 2003.
- [8] E. J. Angtuaco, A. B. Fassas, R. Walker, *et coll.* Multiple myeloma: clinical review and diagnostic imaging. *Radiology* 231: 11-23; 2004.
- [9] R. Badraoui, N. B. Abdelmoula, Z. Sahnoun, *et coll.* Effect of subchronic exposure to tetradifon on bone remodelling and metabolism in female rat. *C R Biol* 330: 897-904; 2007.
- [10] R. Badraoui, Z. Sahnoun, N. A. Bouayed, *et coll.* May antioxidants status depletion by Tetradifon induce secondary genotoxicity in female wistar rat via oxidative stress? *Pestic Biochem Physiol* 88: 149-55; 2007.
- [11] L. Bao, M. Loda, P. A. Janmey, *et coll.* Thymosin beta 15: a novel regulator of tumor cell motility upregulated in metastatic prostate cancer. *Nat Med* 2: 1322-8; 1996.
- [12] S. Barillé, R. Bataille and M. Amiot. The role of interleukin-6 and interleukin-6/interleukin-6 receptor- α complex in the pathogenesis of multiple myeloma. *Eur Cytokine Netw* 11: 546-51; 2000.
- [13] R. Baron. Molecular mechanisms of bone resorption. An update. *Acta Orthop Scand Suppl* 266: 66-70; 1995.
- [14] S. Baron, J. Battin, A. David, *et coll.* Precocious puberty in children adopted from foreign countries. *Arch Pediatr* 7: 809-16; 2000.

- [15] A. E. Bayoumi, Y. Perez-Pertejo, C. Ordonez, *et coll.* Changes in the glutathione-redox balance induced by the pesticides heptachlor, chlordane, and toxaphene in CHO-K1 cells. *Bull Environ Contam Toxicol* 65: 748-55; 2000.
- [16] P. A. Beachy, S. S. Karhadkar and D. M. Berman. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* 432: 324-31; 2004.
- [17] E. J. Beddowes, S. P. Faux and J. K. Chipman. Chloroform, carbon tetrachloride and glutathione depletion induce secondary genotoxicity in liver cells via oxidative stress. *Toxicology* 187: 101-15; 2003.
- [18] M. S. Bendre, D. Gaddy-Kurten, T. Mon-Foote, *et coll.* Expression of interleukin 8 and not parathyroid hormone-related protein by human breast cancer cells correlates with bone metastasis in vivo. *Cancer Res* 62: 5571-9; 2002.
- [19] J. Berdah. What a healthy lifestyle stands for at the menopause: the role of the gynaecologist. *Gynecol Obstet Fertil* 35: 785-90; 2007.
- [20] M. M. Berger. Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances Nutrition clinique et métabolisme. *Nutr Clin Métab* 20: 48-53; 2006.
- [21] J. P. Biggerstaff, N. Seth, A. Amirkhosravi, *et coll.* Soluble fibrin augments platelet/tumor cell adherence in vitro and in vivo, and enhances experimental metastasis. *Clin Exp Metastasis* 17: 723-30; 1999.
- [22] J. Blade and L. Rosinol. Renal, hematologic and infectious complications in multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol* 18: 635-52; 2005.
- [23] S. Blouin, M. F. Baslé and D. Chappard. Rat models of bone metastases. *Clin Exp Metastasis* 22: 605-14; 2005.
- [24] S. Blouin, M. F. Moreau, M. F. Basle, *et coll.* Relations between radiograph texture analysis and microcomputed tomography in two rat models of bone metastases. *Cells Tissues Organs* 182: 182-92; 2006.
- [25] J. J. Body and I. Mancini. Bisphosphonates for cancer patients: why, how, and when? *Support Care Cancer* 10: 399-407; 2002.
- [26] P. Boffetta, O. van der Hel, H. Norppa, *et coll.* Chromosomal aberrations and cancer risk: results of a cohort study from Central Europe. *Am J Epidemiol* 165: 36-43; 2007.
- [27] S. Boissier, S. Magnetto, L. Frappart, *et coll.* Bisphosphonates inhibit prostate and breast carcinoma cell adhesion to unmineralized and mineralized bone extracellular matrices. *Cancer Res* 57: 3890-4; 1997.
- [28] R. D. Bonfil, S. Chinni, R. Fridman, *et coll.* Proteases, growth factors, chemokines, and the microenvironment in prostate cancer bone metastasis. *Urol Oncol* 25: 407-11; 2007.

- [29] A. Boucharaba, C. M. Serre, S. Gres, *et coll.* Platelet-derived lysophosphatidic acid supports the progression of osteolytic bone metastases in breast cancer. *J Clin Invest* 114: 1714-25; 2004.
- [30] S. Boufous, C. F. Finch and S. R. Lord. Incidence of hip fracture in New South Wales: are our efforts having an effect? *Med J Aust* 180: 623-6; 2004.
- [31] H. L. Bradlow, D. L. Davis, G. Lin, *et coll.* Effects of pesticides on the ratio of 16 alpha/2-hydroxyestrone: a biologic marker of breast cancer risk. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 7: 147-50; 1995.
- [32] A. Brouwer, M. P. Longnecker, L. S. Birnbaum, *et coll.* Characterization of potential endocrine-related health effects at low-dose levels of exposure to PCBs. *Environ Health Perspect* 107 Suppl 4: 639-49; 1999.
- [33] H. U. Bryant, A. L. Glasebrook, N. N. Yang, *et coll.* An estrogen receptor basis for raloxifene action in bone. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69: 37-44; 1999.
- [34] J. C. Buckland-Wright, J. A. Lynch and D. G. Macfarlane. Fractal signature analysis measures cancellous bone organisation in macroradiographs of patients with knee osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 55: 749-55; 1996.
- [35] J. Buehler, P. Chappuis, J. L. Saffar, *et coll.* Strontium ranelate inhibits bone resorption while maintaining bone formation in alveolar bone in monkeys (*Macaca fascicularis*). *Bone* 29: 176-9; 2001.
- [36] W. Burkart, T. Jung and G. Frasch. Damage pattern as a function of radiation quality and other factors. *C R Acad Sci III* 322: 89-101; 1999.
- [37] C. B. Caldwell, E. L. Moran and E. R. Bogoch. Fractal dimension as a measure of altered trabecular bone in experimental inflammatory arthritis. *J Bone Miner Res* 13: 978-85; 1998.
- [38] D. Chappard, S. Blouin, H. Libouban, *et coll.* Microcomputed tomography for the study of hard tissues and bone biomaterials. *Microscopy & Analysis*. 19: 17-9; 2005.
- [39] D. Chappard, A. Chennebault, M. Moreau, *et coll.* Texture analysis of X-ray radiographs is a more reliable descriptor of bone loss than mineral content in a rat model of localized disuse induced by the *Clostridium botulinum* toxin. *Bone*. 28: 72-9.; 2001.
- [40] D. Chappard, P. Guggenbuhl, E. Legrand, *et coll.* Texture analysis of X-ray radiographs is correlated with bone histomorphometry. *J Bone Miner Metab* 23: 24-9; 2005.
- [41] D. Chappard, N. Josselin, C. Rouge-Maillart, *et coll.* Bone microarchitecture in males with corticosteroid-induced osteoporosis. *Osteoporos Int* 18: 487-94; 2007.
- [42] D. Chappard, E. Legrand, P. Massin, *et coll.* Pathophysiology of bone metastases. *Prog Urol* 13: 9-17; 2003.

- [43] D. Chappard, S. Palle, C. Alexandre, *et coll.* Bone embedding in pure methyl methacrylate at low temperature preserves enzyme activities. *Acta Histochem* 81: 183-90; 1987.
- [44] D. Chappard, N. Retailleau-Gaborit, E. Legrand, *et coll.* Comparison Insight Bone Measurements by Histomorphometry and μ CT. *J Bone Miner Res* 20: 1177-84; 2005.
- [45] A. M. Charissou, C. Cossu-Leguille and P. Vasseur. Relationship between two oxidative stress biomarkers, malondialdehyde and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, in the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Sci Total Environ* 322: 109-22; 2004.
- [46] A. M. Charissou, M. J. Jourdain, P. Pandard, *et coll.* Optimal framework for a battery of bioassay selection for ecotoxicological evaluation of complex environments: A bibliographical synthesis *Techniques - Sciences - Methodes* 5: 101-9; 2006.
- [47] C. Charlier and G. Plomteux. [Environmental chemical pollution and toxic risk for humans: the particular role of organochlorine pesticides]. *Ann Biol Clin (Paris)* 60: 37-46; 2002.
- [48] G. Chen, N. Shukeir, A. Potti, *et coll.* Up-regulation of Wnt-1 and beta-catenin production in patients with advanced metastatic prostate carcinoma: potential pathogenetic and prognostic implications. *Cancer* 101: 1345-56; 2004.
- [49] H. C. Cheng, H. Chien, C. H. Liao, *et coll.* Carotenoids suppress proliferating cell nuclear antigen and cyclin D1 expression in oral carcinogenic models. *J Nutr Biochem* 18: 667-75; 2007.
- [50] J. K. Chipman, J. L. Parsons and E. J. Beddowes. The multiple influences of glutathione on bromate genotoxicity: implications for the dose-response relationship. *Toxicology* 221: 187-9; 2006.
- [51] E. Cho, D. J. Hunter, D. Spiegelman, *et coll.* Intakes of vitamins A, C and E and folate and multivitamins and lung cancer: a pooled analysis of 8 prospective studies. *Int J Cancer* 118: 970-8; 2006.
- [52] S. J. Choi, J. C. Cruz, F. Craig, *et coll.* Macrophage inflammatory protein 1-alpha is a potential osteoclast stimulatory factor in multiple myeloma. *Blood* 96: 671-5; 2000.
- [53] S. J. Choi, Y. Oba, Y. Gazitt, *et coll.* Antisense inhibition of macrophage inflammatory protein 1-alpha blocks bone destruction in a model of myeloma bone disease. *J Clin Invest* 108: 1833-41; 2001.
- [54] P. Collin-Osdoby, L. Rothe, F. Anderson, *et coll.* Receptor activator of NF-kappa B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 276: 20659-72; 2001.
- [55] C. R. Cooper and K. J. Pienta. Cell adhesion and chemotaxis in prostate cancer metastasis to bone: a minireview. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 3: 6-12; 2000.

- [56] O. Couturier, A. Luxen, J. F. Chatal, *et coll.* Fluorinated tracers for imaging cancer with positron emission tomography. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 31: 1182-206; 2004.
- [57] S. D. Cramer, Z. Chen and D. M. Peehl. Prostate specific antigen cleaves parathyroid hormone-related protein in the PTH-like domain: inactivation of PTHrP-stimulated cAMP accumulation in mouse osteoblasts. *J Urol* 156: 526-31; 1996.
- [58] S. R. Cummings, S. Eckert, K. A. Krueger, *et coll.* The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation. *Jama* 281: 2189-97; 1999.
- [59] S. G. Dahl, P. Allain, P. J. Marie, *et coll.* Incorporation and distribution of strontium in bone. *Bone* 28: 446-53; 2001.
- [60] F. Daubine, C. Le Gall, J. Gasser, *et coll.* Antitumor effects of clinical dosing regimens of bisphosphonates in experimental breast cancer bone metastasis. *J Natl Cancer Inst* 99: 322-30; 2007.
- [61] G. R. Davis and F. S. Wong. X-ray microtomography of bones and teeth. *Physiol Meas* 17: 121-46; 1996.
- [62] J. de la Mata, H. L. Uy, T. A. Guise, *et coll.* Interleukin-6 enhances hypercalcemia and bone resorption mediated by parathyroid hormone-related protein in vivo. *J Clin Invest* 95: 2846-52; 1995.
- [63] M. de Vernejoul. L'os, un domaine qui émerge. *Med Sci* 17: 1239-41; 2001.
- [64] G. Demisia, D. Vlastos, M. Goumenou, *et coll.* Assessment of the genotoxicity of imidacloprid and metalaxyl in cultured human lymphocytes and rat bone-marrow. *Mutat Res* 634: 32-9; 2007.
- [65] L. Donbak, E. Rencuzogullari, A. Yavuz, *et coll.* The genotoxic risk of underground coal miners from Turkey. *Mutat Res* 588: 82-7; 2005.
- [66] A. Elizabeth, M. D. Peralta, T. Aaron, *et coll.* Vitamin E Increases Biomarkers of Estrogen Stimulation When Taken With Tamoxifen. *J Surg Res*: (in press); 2008.
- [67] S. Ennaceur, D. Ridha and R. Marcos. Genotoxicity of the organochlorine pesticides 1,1-dichloro-2,2- bis(p-chlorophenyl)ethylene (DDE) and hexachlorobenzene (HCB) in cultured human lymphocytes. *Chemosphere*: 2007.
- [68] K. E. Ensrud, J. L. Stock, E. Barrett-Connor, *et coll.* Effects of raloxifene on fracture risk in postmenopausal women: the raloxifene use for the heart trial. *J Bone Miner Res* 23: 112-20; 2008.
- [69] E. F. Eriksen, D. S. Colvard, N. J. Berg, *et coll.* Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science* 241: 84-6; 1988.
- [70] A. Erlebacher, E. H. Filvaroff, J. Q. Ye, *et coll.* Osteoblastic responses to TGF-beta during bone remodeling. *Mol Biol Cell* 9: 1903-18; 1998.

- [71] H. Esterbauer and K. H. Cheeseman. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186: 407-21; 1990.
- [72] C. L. Fattman, L. M. Schaefer and T. D. Oury. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic Biol Med* 35: 236-56; 2003.
- [73] J. L. Ferretti, G. R. Cointry, R. F. Capozza, *et coll.* Bone mass, bone strength, muscle-bone interactions, osteopenias and osteoporoses. *Mech Ageing Dev* 124: 269-79; 2003.
- [74] J. Fielden, G. Purdie, G. Horne, *et coll.* Hip fracture incidence in New Zealand, revisited. *N Z Med J* 114: 154-6; 2001.
- [75] R. Fodde and R. Smits. Cancer biology. A matter of dosage. *Science* 298: 761-3; 2002.
- [76] G. Francini, M. Montagnani, R. Petrioli, *et coll.* Comparison between CEA, TPA, CA 15/3 and hydroxyproline, alkaline phosphatase, whole body retention of ^{99m}Tc MDP in the follow-up of bone metastases in breast cancer. *Int J Biol Markers* 5: 65-72; 1990.
- [77] Q. Fu, R. L. Jilka, S. C. Manolagas, *et coll.* Parathyroid hormone stimulates receptor activator of NFkappa B ligand and inhibits osteoprotegerin expression via protein kinase A activation of cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem* 277: 48868-75; 2002.
- [78] R. Galli, E. Binda, U. Orfanelli, *et coll.* Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 64: 7011-21; 2004.
- [79] M. Garlatti and R. Barouki. Le stress du réticulum endoplasmique: adaptation et toxicité. *Med Sci* 18: 585-94; 2002.
- [80] D. Gerald, E. Berra, Y. M. Frapart, *et coll.* JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. *Cell* 118: 781-94; 2004.
- [81] D. Gerald, M. Yaniv and F. Mechta-Grigoriou. Oxidative stress and angiogenesis: major role of AP-1. *Med Sci (Paris)* 21: 233-5; 2005.
- [82] D. Goltzman. Osteolysis and cancer. *J Clin Invest* 107: 1219-20; 2001.
- [83] A. Gougelet, S. O. Mueller, K. S. Korach, *et coll.* Oestrogen receptors pathways to oestrogen responsive elements: the transactivation function-1 acts as the keystone of oestrogen receptor (ER)beta-mediated transcriptional repression of ERalpha. *J Steroid Biochem Mol Biol* 104: 110-22; 2007.
- [84] J. R. Green and P. Clézardin. Mechanisms of bisphosphonate effects on osteoclasts, tumor cell growth, and metastasis. *Am J Clin Oncol* 25: S3-9; 2002.
- [85] F. Grizon, E. Aguado, G. Hure, *et coll.* Enhanced bone integration of implants with increased surface roughness: a long term study in the sheep. *J Dent* 30: 195-203; 2002.

- [86] M. D. Grynblas, E. Hamilton, R. Cheung, *et coll.* Strontium increases vertebral bone volume in rats at a low dose that does not induce detectable mineralization defect. *Bone* 18: 253-9; 1996.
- [87] P. Guggenbuhl, F. Bodic, L. Hamel, *et coll.* Texture analysis of X-ray radiographs of iliac bone is correlated with bone micro-CT. *Osteoporos Int* 17: 447-54; 2006.
- [88] T. A. Guise and G. R. Mundy. Cancer and bone. *Endocrine Reviews* 19: 18-54; 1998.
- [89] T. A. Guise, J. J. Yin and K. S. Mohammad. Role of endothelin-1 in osteoblastic bone metastases. *Cancer* 97: 779-84; 2003.
- [90] J. J. Haddad. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cell Signal* 14: 879-97; 2002.
- [91] J. M. Halasy-Nagy, G. A. Rodan and A. A. Reszka. Inhibition of bone resorption by alendronate and risedronate does not require osteoclast apoptosis. *Bone* 29: 553-9; 2001.
- [92] C. L. Hall, S. Kang, O. A. MacDougald, *et coll.* Role of Wnts in prostate cancer bone metastases. *J Cell Biochem* 97: 661-72; 2006.
- [93] J. M. Halleen, S. Raisanen, J. J. Salo, *et coll.* Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *J Biol Chem* 274: 22907-10; 1999.
- [94] J. M. Halleen, H. Ylipahkala, S. L. Alatalo, *et coll.* Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b, but not 5a, correlates with other markers of bone turnover and bone mineral density. *Calcif Tissue Int* 71: 20-5; 2002.
- [95] B. Halliwell. Mechanisms involved in the generation of free radicals. *Pathol Biol (Paris)* 44: 6-13; 1996.
- [96] Y. Hamma-Kourbali, M. Di Benedetto, D. Ledoux, *et coll.* A novel non-containing-nitrogen bisphosphonate inhibits both in vitro and in vivo angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 310: 816-23; 2003.
- [97] D. Hanahan and J. Folkman. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-64; 1996.
- [98] T. J. Hartman, J. F. Dorgan, K. Woodson, *et coll.* Effects of long-term alpha-tocopherol supplementation on serum hormones in older men. *Prostate* 46: 33-8; 2001.
- [99] T. J. Harvey, J. D. Hooper, S. A. Myers, *et coll.* Tissue-specific expression patterns and fine mapping of the human kallikrein (KLK) locus on proximal 19q13.4. *J Biol Chem* 275: 37397-406; 2000.
- [100] K. Hashimoto, K. Morishige, K. Sawada, *et coll.* Alendronate suppresses tumor angiogenesis by inhibiting Rho activation of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 354: 478-84; 2007.

- [101] R. Hasserijs, M. K. Karlsson, B. Jonsson, *et coll.* Long-term morbidity and mortality after a clinically diagnosed vertebral fracture in the elderly--a 12- and 22-year follow-up of 257 patients. *Calcif Tissue Int* 76: 235-42; 2005.
- [102] I. P. Heilberg, E. Hernandez, E. Alonzo, *et coll.* Estrogen receptor (ER) gene polymorphism may predict the bone mineral density response to raloxifene in postmenopausal women on chronic hemodialysis. *Ren Fail* 27: 155-61; 2005.
- [103] L. C. Hofbauer and A. E. Heufelder. Clinical review 114: hot topic. The role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in the pathogenesis and treatment of metabolic bone diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 2355-63; 2000.
- [104] M. Hui and H. C. Tenenbaum. New face of an old enzyme: alkaline phosphatase may contribute to human tissue aging by inducing tissue hardening and calcification. *Anat Rec* 253: 91-4; 1998.
- [105] C. Jamin, F. Bourg, J. Legeai, *et coll.* [Is the clinical profile of women treated with tibolone similar to that of women receiving a classical estrogen-progestogen therapy? Data from a nationwide survey in France]. *Gynecol Obstet Fertil* 34: 224-32; 2006.
- [106] Y. Jiang, J. Zhao and H. Genant. Effects of strontium ranelate on 3D cortical and trabecular microarchitecture in postmenopausal osteoporosis in multicenter, double-blind, and placebo controled studies. *Osteoporos Int* 18: 40; 2006.
- [107] R. L. Jilka. Cytokines, bone remodeling, and estrogen deficiency: a 1998 update. *Bone* 23: 75-81; 1998.
- [108] H. Jinnai, H. Watashiba, T. Kajihara, *et coll.* Surface curvatures of trabecular bone microarchitecture. *Bone* 30: 191-4; 2002.
- [109] S. M. Kakonen, K. S. Selander, J. M. Chirgwin, *et coll.* Transforming growth factor-beta stimulates parathyroid hormone-related protein and osteolytic metastases via Smad and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J Biol Chem* 277: 24571-8; 2002.
- [110] Y. Kang, P. M. Siegel, W. Shu, *et coll.* A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* 3: 537-49; 2003.
- [111] E. T. Keller, J. Zhang, C. R. Cooper, *et coll.* Prostate carcinoma skeletal metastases: cross-talk between tumor and bone. *Cancer Metastasis Rev* 20: 333-49; 2001.
- [112] S. Khosla. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 142: 5050-5; 2001.
- [113] S. Khosla, L. J. Melton, 3rd, E. J. Atkinson, *et coll.* Relationship of serum sex steroid levels and bone turnover markers with bone mineral density in men and women: a key role for bioavailable estrogen. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 2266-74; 1998.
- [114] C. S. Killian, D. A. Corral, E. Kawinski, *et coll.* Mitogenic response of osteoblast cells to prostate-specific antigen suggests an activation of latent TGF-beta and a proteolytic modulation of cell adhesion receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 192: 940-7; 1993.

- [115] M. Kinder, E. Chislock, K. M. Bussard, *et coll.* Metastatic breast cancer induces an osteoblast inflammatory response. *Exp Cell Res* 314: 173-83; 2008.
- [116] V. A. Kirsh, R. B. Hayes, S. T. Mayne, *et coll.* Supplemental and dietary vitamin E, beta-carotene, and vitamin C intakes and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 98: 245-54; 2006.
- [117] E. A. Klein, S. M. Lippman, I. M. Thompson, *et coll.* The selenium and vitamin E cancer prevention trial. *World J Urol* 21: 21-7; 2003.
- [118] A. D. Kligerman, C. L. Doerr, A. H. Tennant, *et coll.* Cytogenetic studies of three triazine herbicides. II. In vivo micronucleus studies in mouse bone marrow. *Mutat Res* 471: 107-12; 2000.
- [119] M. L. Knothe Tate, J. R. Adamson, A. E. Tami, *et coll.* The osteocyte. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 1-8; 2004.
- [120] K. S. Koeneman, F. Yeung and L. W. Chung. Osteomimetic properties of prostate cancer cells: a hypothesis supporting the predilection of prostate cancer metastasis and growth in the bone environment. *Prostate* 39: 246-61; 1999.
- [121] P. J. Kostenuik, O. Sanchez-Sweetman, F. W. Orr, *et coll.* Bone cell matrix promotes the adhesion of human prostatic carcinoma cells via the alpha 2 beta 1 integrin. *Clin Exp Metastasis* 14: 19-26; 1996.
- [122] W. Kozlow and T. A. Guise. Breast cancer metastasis to bone: mechanisms of osteolysis and implications for therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 10: 169-80; 2005.
- [123] M. Krstevska-Konstantinova, C. Charlier, M. Craen, *et coll.* Sexual precocity after immigration from developing countries to Belgium: evidence of previous exposure to organochlorine pesticides. *Hum Reprod* 16: 1020-6; 2001.
- [124] M. S. Kung Sutherland, S. G. Lipps, N. Patnaik, *et coll.* SP500263, a novel SERM, blocks osteoclastogenesis in a human bone cell model: role of IL-6 and GM-CSF. *Cytokine* 23: 1-14; 2003.
- [125] V. Kunzmann, E. Bauer, J. Feurle, *et coll.* Stimulation of gammadelta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood* 96: 384-92; 2000.
- [126] A. T. Lau, Y. Wang and J. F. Chiu. Reactive oxygen species: Current knowledge and applications in cancer research and therapeutic. *J Cell Biochem* 104: 657-67; 2008.
- [127] Y. Lee, E. Schwarz, M. Davies, *et coll.* Differences in the cytokine profiles associated with prostate cancer cell induced osteoblastic and osteolytic lesions in bone. *J Orthop Res* 21: 62-72; 2003.

- [128] M. Lein, M. Wirth, K. Miller, *et coll.* Serial Markers of Bone Turnover in Men with Metastatic Prostate Cancer Treated with Zoledronic Acid for Detection of Bone Metastases Progression. *Eur Urol* 52: 1381-7; 2007.
- [129] J. Li, M. A. Miller, G. D. Hutchins, *et coll.* Imaging bone microdamage in vivo with positron emission tomography. *Bone* 37: 819-24; 2005.
- [130] H. Libouban, M. F. Moreau, M. Lessourd, *et coll.* Osteolytic bone lesions in the 5T2 multiple myeloma: Radiographic, scanning electron microscopy, and microtomographic studies. *J Histotechnol* 24: 81-6; 2001.
- [131] P. M. Lind, M. R. Milnes, R. Lundberg, *et coll.* Abnormal bone composition in female juvenile American alligators from a pesticide-polluted lake (Lake Apopka, Florida). *Environ Health Perspect* 112: 359-62; 2004.
- [132] T. M. Link, S. Majumdar, S. Grampp, *et coll.* Imaging of trabecular bone structure in osteoporosis. *Eur Radiol* 9: 1781-8; 1999.
- [133] Y. L. Liu, J. M. Yu, X. R. Song, *et coll.* Regulation of the Chemokine Receptor CXCR4 and Metastasis by Hypoxia-inducible Factor in Non Small Cell Lung Cancer Cell Lines. *Cancer Biol Ther* 5: 2006.
- [134] C. J. Logothetis and S. H. Lin. Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nat Rev Cancer* 5: 21-8; 2005.
- [135] Q. L. Mao-Ying, J. Zhao, Z. Q. Dong, *et coll.* A rat model of bone cancer pain induced by intra-tibia inoculation of Walker 256 mammary gland carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 345: 1292-8; 2006.
- [136] M. Maravic, C. Le Bihan, P. Landais, *et coll.* Incidence and cost of osteoporotic fractures in France during 2001. A methodological approach by the national hospital database. *Osteoporos Int* 16: 1475-80; 2005.
- [137] A. Marchand, C. Tomkiewicz, L. Magne, *et coll.* Endoplasmic reticulum stress induction of insulin-like growth factor-binding protein-1 involves ATF4. *J Biol Chem* 281: 19124-33; 2006.
- [138] R. Marcus, M. Wong, H. Heath, *et coll.* Antiresorptive treatment of postmenopausal osteoporosis: comparison of study designs and outcomes in large clinical trials with fracture as an endpoint. *Endocr Rev* 23: 16-37; 2002.
- [139] J. M. McCord and M. A. Edeas. SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. *Biomed Pharmacother* 59: 139-42; 2005.
- [140] J. C. McGinley, N. Roach, J. P. Gaughan, *et coll.* Forearm interosseous membrane imaging and anatomy. *Skeletal Radiol* 33: 561-8; 2004.
- [141] J. C. McGinley, N. Roach, B. C. Hopgood, *et coll.* Forearm interosseous membrane trauma: MRI diagnostic criteria and injury patterns. *Skeletal Radiol* 35: 275-81; 2006.

- [142] A. Muller, B. Homey, H. Soto, *et coll.* Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410: 50-6; 2001.
- [143] G. R. Mundy. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2: 584-93; 2002.
- [144] S. Muthusami, I. Ramachandran, B. Muthusamy, *et coll.* Ovariectomy induces oxidative stress and impairs bone antioxidant system in adult rats. *Clin Chim Acta* 360: 81-6; 2005.
- [145] T. Nakamura, Y. Imai, T. Matsumoto, *et coll.* Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell* 130: 811-23; 2007.
- [146] P. S. Narayana Murthy, S. Sengupta, S. Sharma, *et coll.* Effect of ormeloxifene on ovariectomy-induced bone resorption, osteoclast differentiation and apoptosis and TGF beta-3 expression. *J Steroid Biochem Mol Biol* 100: 117-28; 2006.
- [147] S. Narisawa, N. Frohlander and J. L. Millan. Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. *Dev Dyn* 208: 432-46; 1997.
- [148] S. Nemmiche, D. Chabane-Sari and P. Guiraud. Role of alpha-tocopherol in cadmium-induced oxidative stress in Wistar rat's blood, liver and brain. *Chem Biol Interact* 170: 221-30; 2007.
- [149] W. Niepolomski, Z. Szczurek, A. Kolodziejczyk, *et coll.* Morphological studies upon shortened chronic akaritox toxicity in rats (in Polish). *Med Prac* 23: 577-84; 1972.
- [150] K. M. Nikolic. Design and QSAR study of analogs of alpha-tocopherol with enhanced antiproliferative activity against human breast adenocarcinoma cells. *J Mol Graph Model* 26: 868-73; 2008.
- [151] H. Norppa, S. Bonassi, I. L. Hansteen, *et coll.* Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutat Res* 600: 37-45; 2006.
- [152] D. V. Novack. Estrogen and bone: osteoclasts take center stage. *Cell Metab* 6: 254-6; 2007.
- [153] A. Odgaard. Three-dimensional methods for quantification of cancellous bone architecture. *Bone* 20: 315-28; 1997.
- [154] M. J. Oursler, P. Osdoby, J. Pyfferoen, *et coll.* Avian osteoclasts as estrogen target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 6613-7; 1991.
- [155] M. Paillard, M. Froissart and P. Houillier. Régulation intégrée de la calcémie. *Immunoanal Biol Spéc* 36: 9-16; 1992.
- [156] G. Pampalakis and G. Sotiropoulou. Tissue kallikrein proteolytic cascade pathways in normal physiology and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1776: 22-31; 2007.

- [157] P. Paul. Modification de l'expression des molécules de classe I du complexe majeur d'histo-compatibilité. *Médecine/Science* 6: 449-55; 1990.
- [158] F. Paycha, S. Maia, N. Ayachi, *et coll.* Quelle est la signification des anomalies observées en scintigraphie osseuse ? : Retour sur les mécanismes de fixation des bisphosphonates-(^{99m}Tc). *Méd Nucl* 31: 356-65; 2007.
- [159] L. Pederson, M. Kremer, N. T. Foged, *et coll.* Evidence of a correlation of estrogen receptor level and avian osteoclast estrogen responsiveness. *J Bone Miner Res* 12: 742-52; 1997.
- [160] P. Perimenis, J. L. Wemeau and M. C. Vantghem. Hypercalciuria. *Ann Endocrinol (Paris)* 66: 532-9; 2005.
- [161] D. Q. Pham and R. Plakogiannis. Vitamin E supplementation in cardiovascular disease and cancer prevention: Part 1. *Ann Pharmacother* 39: 1870-8; 2005.
- [162] T. A. Plunkett, P. Smith and R. D. Rubens. Risk of complications from bone metastases in breast cancer. implications for management. *Eur J Cancer* 36: 476-82; 2000.
- [163] J. Pouyssegur and F. Mechta-Grigoriou. Redox regulation of the hypoxia-inducible factor. *Biol Chem* 387: 1337-46; 2006.
- [164] C. Ribot and F. Tremollieres. Hormone replacement therapy in postmenopausal women: all the treatments are not the same. *Gynecol Obstet Fertil* 35: 388-97; 2007.
- [165] C. Ribot, F. Tremollieres and J. M. Pouilles. [Estrogens and selective estrogen receptor modulators in the treatment of osteoporosis]. *Ann Med Interne (Paris)* 151: 490-6; 2000.
- [166] S. Richard, S. Moslemi, H. Sipahutar, *et coll.* Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. *Environ Health Perspect* 113: 716-20; 2005.
- [167] B. L. Riggs. The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. *J Clin Invest* 106: 1203-4; 2000.
- [168] B. L. Riggs, S. Khosla and L. J. Melton, 3rd. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev* 23: 279-302; 2002.
- [169] R. Rizzoli and J. P. Bonjour. Determinants of peak bone mass and mechanisms of bone loss. *Osteoporos Int* 9 Suppl 2: S17-23; 1999.
- [170] R. Rizzoli, J. P. Bonjour and S. L. Ferrari. Osteoporosis, genetics and hormones. *J Mol Endocrinol* 26: 79-94; 2001.
- [171] E. J. Robson, S. J. He and M. R. Eccles. A PANorama of PAX genes in cancer and development. *Nat Rev Cancer* 6: 52-62; 2006.
- [172] M. J. Rogers. New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Curr Pharm Des* 9: 2643-58; 2003.

- [173] M. J. Rogers, S. Gordon, H. L. Benford, *et coll.* Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer* 88: 2961-78; 2000.
- [174] G. Roodman. Mechanisms of bone lesions in multiple myeloma and lymphoma. *Cancer* 80: 1557-63; 1997.
- [175] G. D. Roodman. Cell biology of the osteoclast. *Exp Hematol* 27: 1229-41; 1999.
- [176] G. D. Roodman. Role of stromal-derived cytokines and growth factors in bone metastasis. *Cancer* 97: 733-8; 2003.
- [177] G. D. Roodman. Mechanisms of bone metastasis. *N Engl J Med* 350: 1655-64; 2004.
- [178] P. Sambrook and C. Cooper. Osteoporosis. *Lancet* 367: 2010-8; 2006.
- [179] L. Shiyin, N. Lixiao, P. Panying, *et coll.* Effects of pesticides and their hydrolysates on catalase activity in soil. *Bull Environ Contam Toxicol* 72: 600-6; 2004.
- [180] S. C. Sikka and R. Wang. Endocrine disruptors and estrogenic effects on male reproductive axis. *Asian J Androl* 10: 134-45; 2008.
- [181] M. J. Silva, B. A. Uthgenannt, J. R. Rutlin, *et coll.* In vivo skeletal imaging of (18)F-fluoride with positron emission tomography reveals damage- and time-dependent responses to fatigue loading in the rat ulna. *Bone* 39: 229-36; 2006.
- [182] S. K. Singh, I. D. Clarke, M. Terasaki, *et coll.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63: 5821-8; 2003.
- [183] P. Stieber, D. Nagel, C. Ritzke, *et coll.* Significance of bone alkaline phosphatase, CA 15-3 and CEA in the detection of bone metastases during the follow-up of patients suffering from breast carcinoma. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 30: 809-14; 1992.
- [184] E. Straube, W. Straube, E. Kruger, *et coll.* Disruption of male sex hormones with regard to pesticides: pathophysiological and regulatory aspects. *Toxicol Lett* 107: 225-31; 1999.
- [185] V. Stresing, F. Daubine, I. Benzaid, *et coll.* Bisphosphonates in cancer therapy. *Cancer Lett* 257: 16-35; 2007.
- [186] R. M. Strieter. Chemokines: not just leukocyte chemoattractants in the promotion of cancer. *Nat Immunol* 2: 285-6; 2001.
- [187] T. Suda, N. Takahashi, N. Udagawa, *et coll.* Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20: 345-57; 1999.
- [188] T. Suda, Y. Ueno, K. Fujii, *et coll.* Vitamin D and bone. *J Cell Biochem* 88: 259-66; 2003.

- [189] K. Tantivejkul, L. M. Kalikin and K. J. Pienta. Dynamic process of prostate cancer metastasis to bone. *J Cell Biochem* 91: 706-17; 2004.
- [190] Y. Terasawa, Z. Ladha, S. W. Leonard, *et coll.* Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice deficient in alpha -tocopherol transfer protein and vitamin E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13830-4; 2000.
- [191] P. Thonneau, S. B. Larsen, A. Abell, *et coll.* Time to pregnancy and paternal exposure to pesticides in preliminary results from Danish and French studies. *Asclepios. Scand J Work Environ Health* 25 Suppl 1: 62-3; discussion 76-8; 1999.
- [192] E. Tian, F. Zhan, R. Walker, *et coll.* The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med* 349: 2483-94; 2003.
- [193] A. M. Tope and M. Panemangalore. Assessment of oxidative stress due to exposure to pesticides in plasma and urine of traditional limited-resource farm workers: formation of the DNA-adduct 8-hydroxy-2-deoxy-guanosine (8-OHdG). *J Environ Sci Health B* 42: 151-5; 2007.
- [194] T. F. Tozum, M. E. Oppenlander, A. J. Koh-Paige, *et coll.* Effects of sex steroid receptor specificity in the regulation of skeletal metabolism. *Calcif Tissue Int* 75: 60-70; 2004.
- [195] N. Udagawa. Mechanisms involved in bone resorption. *Biogerontology* 3: 79-83; 2002.
- [196] J. Vaaraniemi, J. M. Halleen, K. Kaarlonen, *et coll.* Intracellular machinery for matrix degradation in bone-resorbing osteoclasts. *J Bone Miner Res* 19: 1432-40; 2004.
- [197] G. van der Pluijm, B. Sijmons, H. Vloedgraven, *et coll.* Monitoring metastatic behavior of human tumor cells in mice with species-specific polymerase chain reaction: elevated expression of angiogenesis and bone resorption stimulators by breast cancer in bone metastases. *J Bone Miner Res* 16: 1077-91; 2001.
- [198] L. J. van Ruijven, E. B. Giesen, L. Mulder, *et coll.* The effect of bone loss on rod-like and plate-like trabeculae in the cancellous bone of the mandibular condyle. *Bone* 36: 1078-85; 2005.
- [199] P. Vaupel. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist* 9 Suppl 5: 10-7; 2004.
- [200] J. Virtamo, P. Pietinen, J. K. Huttunen, *et coll.* Incidence of cancer and mortality following alpha-tocopherol and beta-carotene supplementation: a postintervention follow-up. *Jama* 290: 476-85; 2003.
- [201] B. Vogelstein and K. W. Kinzler. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10: 789-99; 2004.

- [202] N. Voorzanger-Rousselot and P. Garnero. Biochemical markers in oncology. Part I: molecular basis. Part II: clinical uses. *Cancer Treat Rev* 33: 230-83; 2007.
- [203] T. Wada, T. Nakashima, N. Hiroshi, *et coll.* RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med* 12: 17-25; 2006.
- [204] A. L. Wallace. Magnetic resonance imaging or ultrasound in assessment of the interosseous membrane of the forearm. *J Bone Joint Surg Am* 84-A: 496-7; 2002.
- [205] N. B. Watts. Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling. *Clin Chem* 45: 1359-68; 1999.
- [206] A. Wetterwald, G. van der Pluijm, I. Que, *et coll.* Optical imaging of cancer metastasis to bone marrow: a mouse model of minimal residual disease. *Am J Pathol* 160: 1143-53; 2002.
- [207] W. J. Whitehouse, E. D. Dyson and C. K. Jackson. The scanning electron microscope in studies of trabecular bone from a human vertebral body. *J Anat* 108: 481-96; 1971.
- [208] R. J. Wilding, J. C. Slabbert, H. Kathree, *et coll.* The use of fractal analysis to reveal remodelling in human alveolar bone following the placement of dental implants. *Arch Oral Biol* 40: 61-72; 1995.
- [209] K. Wu, W. C. Willett, J. M. Chan, *et coll.* A prospective study on supplemental vitamin e intake and risk of colon cancer in women and men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11: 1298-304; 2002.
- [210] K. Yamamoto, M. Matsuda, M. Okuoka, *et coll.* Antioxidation property of vitamin E-coated polysulfone dialysis membrane and recovery of oxidized vitamin E by vitamin C treatment. *J Membrane Sci* 302: 115-8; 2007.
- [211] L. J. Yan and R. S. Sohal. Analysis of oxidative modification of proteins. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 7: Unit 7 9; 2002.
- [212] J. Yang, S. A. Mani, J. L. Donaher, *et coll.* Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117: 927-39; 2004.
- [213] N. N. Yang, H. U. Bryant, S. Hardikar, *et coll.* Estrogen and raloxifene stimulate transforming growth factor-beta 3 gene expression in rat bone: a potential mechanism for estrogen- or raloxifene-mediated bone maintenance. *Endocrinology* 137: 2075-84; 1996.
- [214] B. Yi, P. J. Williams, M. Niewolna, *et coll.* Tumor-derived platelet-derived growth factor-BB plays a critical role in osteosclerotic bone metastasis in an animal model of human breast cancer. *Cancer Res* 62: 917-23; 2002.
- [215] J. J. Yin, C. B. Pollock and K. Kelly. Mechanisms of cancer metastasis to the bone. *Cell Res* 15: 57-62; 2005.
- [216] T. Yoneda and T. Hiraga. Crosstalk between cancer cells and bone microenvironment in bone metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 328: 679-87; 2005.

[217] W. Yu, S. K. Park, L. Jia, *et coll.* RRR-gamma-tocopherol induces human breast cancer cells to undergo apoptosis via death receptor 5 (DR5)-mediated apoptotic signaling. *Cancer Lett* 259: 165-76; 2008.

[218] M. Zaidi, H. C. Blair, B. S. Moonga, *et coll.* Osteoclastogenesis, bone resorption, and osteoclast-based therapeutics. *J Bone Miner Res* 18: 599-609; 2003.

Annexes

Annexe 1

Intermittent fasting effect on bone remodelling and maturation in young rats

M. Kamel, R. Badraoui, Z. Sahnoun, T. Rebai
Nutr. Clin. Metab. 22 (2008) 44-51.

Annexe 2

Erratum to the article: Effect of subchronic exposure to tetradifon on bone remodelling and metabolism in female rat

R. Badraoui, N.B. Abdelmoula, Z. Sahnoun, Z. Fakhfekh, T. Rebai
C. R. Biol. 331 (2008) 98-99.

Annexe 3

Lack of nephrotoxicity following 15-day therapy with high doses of colitin in rats

A. Hakim, H. Kallel, Z. Sahnoun, R. Badraoui, K.M. Zghal, T. Rebai
Med. Sci. Monit. 14 (2008) 74-77.

RESUMÉ : Le remodelage osseux est conditionné par un couplage entre les ostéoclastes et les ostéoblastes. Les xénoestrogènes sont des perturbateurs endocriniens qui peuvent interférer avec le remodelage osseux. Nous nous sommes attachés à étudier l'effet du tetradifon sur le remodelage osseux. Nous avons montré que la perturbation du remodelage et du métabolisme de l'os sont accompagnés d'un effet génotoxique secondaire via les dommages oxydatifs. L'os est le site de métastases de plusieurs tumeurs solides tels que le cancer du sein. Nous avons utilisé les cellules Walker 256/B pour induire des métastases osseuses chez le rat. *In vitro*, le traitement des cellules par l'ATA a apporté des résultats satisfaisants par induction d'apoptose et réduction de l'expression des RLO. Nous avons évalué cet effet, *in vivo*, sur un modèle animal de métastases osseuses ostéolytiques. L'ATA ne prévient pas la perte osseuse mais elle réduit les dommages oxydatifs dans le microenvironnement osseux. La microtomographie et l'histologie ont permis de détecter et de différencier les altérations osseuses induites par métastases ostéolytiques avec ou sans traitement à l'ATA. Nous avons également montré la présence d'os métaplasique, ostéosclérotique, apposé sur les périostes des rats cancéreux et traités à l'ATA. Un bilan hépatorénal du modèle animal de métastases osseuses ostéolytiques a été réalisé. Il paraît que l'inoculation *in situ* des cellules Walker 256 n'avait pas de complications rénales et hépatiques pour cette durée d'étude.

TITLE EN ANGLAIS: Histo-physiopathology of bone microenvironment mediated by tetradifon intoxication and osteolytic bone metastases due to Walker 256/B mammary gland carcinoma cells.

ABSTRACT: Bone remodeling is mediated by the osteoclasts and osteoblasts coupling. Xenestrogens are endocrines disruptors that could interfere with bone remodeling. We have investigated the effect of tetradifon on bone remodeling. We have shown that disturbance of bone remodeling and metabolism were accompanied with a secondary genotoxic effect via oxidative damages. Bone is the main site of metastases for many cancer diseases such as the breast cancer. We have used Walker 256/B to induce bone metastases in rats. *In vitro*, ATA effects on these cells have provided acceptable results by inducing apoptosis and reducing ROS releasing. *In vivo* effects of ATA, have been investigated in a designed several model of breast cancer skeletal metastases. ATA did not prevent the bone loss but reduced the oxidative stress damage in the bone microenvironment. Microtomography and histology were used to detect and differentiate bone alterations due to osteolytic with or without ATA treatment. We have also shown that newly metaplastic, osteosclerotic, apposed bone was observed in the periosteal envelope of cancerous and ATA treated group. A hepatorenal bilan of this animal model of bone metastases was investigated. In this study, it seems that *in situ* inoculation of Walker 256 cells is not associated with renal and hepatic complications.

SPECIALITE: Physiologie et Physiopathologie humaine

Mots clés: SERMs, carcinogenèse, métastases osseuses, physiopathologie, alpha tocophérol, ostéolyse, microCT, Walker 256/B, stress oxydatif, microenvironnement

Intitulé et adresse des laboratoires :

Laboratoire d'Histo-Embryologie, Faculté de Médecine, 3029 SFAX, TUNISIE
INSERM, U922, « Remodelage osseux et biomatériaux », LHEA-49045 ANGERS, FRANCE